



# Réponse adaptative des populations de *Phytophthora* infestans, agent du mildiou de la pomme de terre, au déploiement en culture de son hôte *Solanum tuberosum*

Josselin Montarry

## ► To cite this version:

Josselin Montarry. Réponse adaptative des populations de *Phytophthora* infestans, agent du mildiou de la pomme de terre, au déploiement en culture de son hôte *Solanum tuberosum*. Ecologie, Environnement. Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes, 2007. Français. NNT : . tel-00133363

**HAL Id: tel-00133363**

**<https://theses.hal.science/tel-00133363>**

Submitted on 26 Feb 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° Ordre :  
N° Série :

# THESE

*présentée devant*

**L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES**

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE L'ENSAR

*Mention :*  
Biologie et Agronomie

*par*

**Josselin MONTARRY**

**Réponse adaptative des populations de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre, au déploiement en culture de son hôte *Solanum tuberosum***

Unité Mixte de Recherche INRA/Agrocampus Rennes,  
Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes, Le Rheu  
Equipe 'Caractérisation et Gestion Durable des Résistances des Plantes aux Maladies'

Ecole doctorale Université Rennes I / Agrocampus Rennes : Vie-Agro-Santé

Soutenue le 30 janvier 2007 devant le jury :

A. BOUCHEREAU  
J. SHYKOFF  
M.L. DESPREZ-LOUSTEAU  
O. KALTZ  
M. PLANTEGENEST  
E. GUILLERY  
D. ANDRIVON

Pr., Université Rennes I  
DR, CNRS Paris XI  
DR, INRA Bordeaux  
CR, CNRS Paris VI  
MC, Agrocampus Rennes  
Directeur Bretagne-Plantes, Hanvec  
DR, INRA Rennes

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de Thèse



*Cette thèse a été financée, via une bourse CIFRE, par Bretagne-Plants en tant que représentant de l'ACVNPT (Association des Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre). Je remercie les différents membres de l'association, Bretagne-Plants, Comité Nord, Germicopa et Grocep pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et pour m'avoir autorisé de grandes libertés dans l'orientation de ce travail. Merci plus particulièrement à Emmanuel Guillery, Directeur de Bretagne-Plants, qui a suivi le déroulement de la thèse.*

*Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'UMR BiO3P du centre INRA de Rennes. Je remercie les deux équipes de direction successives que j'aurai connues, Bernard Tivoli, Maurice Hullé et Anne Le Ralec dans un premier temps et Didier Andrivon, Alain Sarniguet et Jean-Christophe Simon ensuite, de m'avoir accueilli dans les murs de l'unité et permis de conduire ma thèse dans d'excellentes conditions de travail.*

*J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'examiner et de juger mon travail de thèse : Alain Bouchereau, Jacqui Shykoff, Marie-Laure Desprez Loustau, Oliver Kaltz, Manuel Plantegenest, Emmanuel Guillery et Didier Andrivon.*

*Un grand merci à l'ensemble des membres de mon comité de thèse : Christian Lannou, Serge Savary, Manuel Plantegenest, Daniel Ellissèche, Emmanuel Guillery et Didier Andrivon ; les échanges lors de ces réunions m'ont beaucoup apporté.*

*Je remercie également Yannis Michalakakis et Olivier Plantard pour avoir relu mes articles ; merci pour vos précieux conseils.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Didier Andrivon, mon directeur de thèse. Merci Didier pour tout ce que tu m'as appris scientifiquement, pour tes conseils, pour ta disponibilité et tes corrections lors de la rédaction des articles et du mémoire de thèse, mais surtout pour la confiance que tu m'accordes. Merci aussi pour tous les bons moments que l'on a passé ensemble que ce soit au labo ou lors de déplacements.*

*Enorme merci à Isabelle Glais et Roselyne Corbière, mais aussi à Bruno Marquer, Hervé Douchy et Claudine Pasco, qui constituent le groupe travaillant sur le mildiou de la pomme de terre à BiO3P, pour leur aide précieuse lors de la réalisation des manips. Merci à ce groupe également pour les bons moments passés ensemble autour de la paillasse. Merci aussi à Elodie Lesné et Gladys Mialdéa qui, lors de leur CDDs, ont participé respectivement aux isollements et à la caractérisation moléculaire des isolats.*

*Merci à Ludovic Dubois du SRPV Nord-Pas-de-Calais, Jean-Marc Abiven, Jo Petton de Bretagne-Plants et Roland Pellé de la station INRA de Ploudaniel pour la mise en place et le suivi des essais et pour leur aide lors des journées d'échantillonnage. Merci aussi à Serge Duvauchelle et Daniel Ellissèche pour avoir accepté d'accueillir dans leurs stations des tas de pommes de terre mildiouées pendant tout un hiver.*

*Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe « résistance » pour nos échanges scientifiques et pour votre sympathie. Merci aussi à l'équipe de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès en France et à l'étranger, et à Florence Val de m'avoir permis d'acquérir une expérience dans l'enseignement en me confiant un groupe d'étudiants du Master d'Agrocampus-Rennes.*

Merci à tout le personnel de l'unité, trop nombreux pour être cité. J'ai passé de très bons moments avec vous tous et je suis heureux d'avoir réalisé ma thèse dans cette unité où je me sens vraiment bien. Les bons souvenirs que je garde de ces trois années de thèse sont d'abord dus aux qualités humaines de tous ceux que j'ai côtoyés au sein de l'unité. Merci à Lionel Lebreton que j'aurai souvent sollicité, lors des manip mais également lors de la rédaction du mémoire de thèse, et à Karima Boucheck, qui fût ma maître de stage de maîtrise, pour m'avoir fait découvrir cette unité.

Merci aux anciens thésards qui ont déjà soutenu : Sabine, Damien, Abou, Florian et Valérie que j'ai côtoyés dans le portakabine mais aussi Alexandra qui est la dernière à avoir soutenu. Merci aussi à ceux qui ont encore entre quelques mois et quelques années avant leur soutenance : Mathieu R., Virgil et Laure je vous apprécie et j'aurais aimé mieux vous connaître, mais surtout Gaël, Renaud, Mathieu B. et Natacha pour votre amitié et pour l'ambiance décontractée que vous avez fait régner depuis votre arrivée, ce qui fût très appréciable surtout lors de la phase finale de rédaction. Bon courage à tous pour la fin de votre thèse.

Merci à Marie, ma collègue de bureau ; nos thèses ont commencé le même jour et c'est grâce à notre motivation mutuelle qu'elles se terminent à la même période et avec si peu de retard. Merci aussi pour tes nombreux conseils, entre autres en statistiques. Je te souhaite un bon postdoc et espère avoir l'occasion de retravailler avec toi.

Merci à Lionel, Frédéric, Gaël, Renaud, Ronan, Arnaud et Natacha pour nos parties de billards d'après manger, et pour les soirées foot ou poker bien sympathiques. Je vous rappelle que Ronan avait les meilleurs pronostiques lors de la coupe du monde, il va falloir qu'on le lui achète son maillot de Materazzi !

Merci à tous mes potes : ceux de mes années passées à Coutances que je n'oublie pas, ceux des deux années passées à Caen et ce que j'ai rencontrés à Rennes lors de ces six dernières années, à la fac, à l'INRA et dans la promo de Capes de Chrystelle. Ils se reconnaîtront.

Enfin, je voudrais remercier ma famille : mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et qui m'ont permis de faire les études que je voulais, m'ouvrant je l'espère les portes d'un métier que je trouve passionnant, mes frères et sœurs (trop nombreux pour être citer) et les parents de Chrystelle. Un grand merci à vous tous pour votre soutien.

Et pour finir, j'adresse un remerciement tout particulier à Chrystelle, la compagne de ma vie et mon soutien de chaque instant. Ton amour, ma douce, m'aura permis de mener à bien mes études qui s'achèvent par cette thèse. Tu connais mon amour et ma gratitude sans que je n'aie besoin de rajouter d'autres mots que MERCI.

## *Table des matières*

# TABLE DES MATIERES

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....  | 1  |
| <b>A. Durabilité des résistances des plantes</b> .....  | 2  |
| <i>A.1. Résistance des plantes</i> .....  | 3  |
| <i>A.2. Pouvoir pathogène des parasites</i> .....   | 8  |
| <i>A.3. Contournement et érosion</i> .....  | 10 |
| <i>A.4. Stratégies de gestion des résistances</i> .....   | 12 |
| <b>B. Coévolution dans les systèmes hôtes-parasites</b> .....   | 15 |
| <i>B.1. Forces évolutives structurant les populations parasites</i> .....   | 15 |
| <i>B.2. Evolution de l'agressivité dans les systèmes hôtes-parasites</i> .....  | 19 |
| <i>B.3. Adaptation locale</i> .....   | 21 |
| <i>B.4. Coévolution des populations d'hôtes et de parasites en système naturel</i> .....  | 23 |
| <i>B.5. Evolution des populations pathogènes en système agricole</i> .....  | 24 |
| <b>C. <i>Phytophthora infestans</i> et la pomme de terre</b> .....  | 26 |
| <i>C.1. Plante hôte</i> .....   | 26 |
| <i>C.2. Maladie</i> .....   | 28 |
| <i>C.3. Agent pathogène</i> .....   | 31 |
| <i>C.4. Avantages du couple <i>P. infestans</i> / pomme de terre en biologie évolutive</i> .....  | 34 |
| <b>D. Objectifs de la thèse</b> .....   | 36 |
| <br><b>STRUCTURATION D'UNE POPULATION PATHOGENE LOCALE PAR DES GÉNOTYPES HÔTES PRÉSENTANT DIFFÉRENTS NIVEAUX DE RÉSISTANCE</b> .....            | 38 |
| <br><b>ARTICLE: Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems?</b> 39                                    |    |
| <b>A. Introduction</b> .....  | 40 |
| <b>B. Materials and methods</b> .....   | 42 |
| <i>B.1. <i>Phytophthora infestans</i> isolates</i> .....  | 42 |
| <i>B.2. Mating type determination</i> .....   | 43 |
| <i>B.3. Pathogenicity tests</i> .....   | 43 |
| <i>B.4. Molecular characterization</i> .....  | 45 |
| <i>B.5. Data analyses</i> .....   | 45 |
| <b>C. Results</b> .....   | 46 |
| <i>C.1. Mating type</i> .....   | 46 |
| <i>C.2. Virulence</i> .....   | 47 |
| <i>C.3. AFLP fingerprints</i> .....   | 48 |
| <i>C.4. Aggressiveness</i> .....  | 49 |
| <b>D. Discussion</b> .....  | 52 |
| <b>E. Acknowledgements</b> .....  | 55 |
| <b>F. References</b> .....  | 55 |
| <br><b>ADAPTATION DES POPULATIONS PATHOGENES AUX VARIÉTÉS DOMINANTES À L'ÉCHELLE DES BASSINS DE PRODUCTION FRANÇAIS</b> .....                   | 60 |
| <br><b>ARTICLE: Testing local adaptation in an agricultural plant-pathogen system: a case of general adaptation to the prevalent host</b> ..... | 62 |
| <b>A. Introduction</b> .....  | 63 |
| <b>B. Materials and Methods</b> .....   | 65 |
| <i>B.1. <i>Phytophthora infestans</i> isolates</i> .....  | 65 |
| <i>B.2. Mating type determination</i> .....   | 66 |

|  |                |
|--|----------------|
| B.3. Pathogenicity tests .....   | 66             |
| B.4. Molecular characterization .....  | 68             |
| B.5. Data analyses .....   | 68             |
| <b>C. Results .....</b>  | <b>70</b>      |
| C.1. Mating type .....   | 70             |
| C.2. Genotypic structure .....   | 70             |
| C.3. Aggressiveness .....  | 72             |
| <b>D. Discussion .....</b>   | <b>76</b>      |
| <b>E. Acknowledgements .....</b>   | <b>79</b>      |
| <b>F. References .....</b>   | <b>79</b>      |
| <br><b>EFFETS DE LA PHASE DE SURVIE HIVERNALE SUR LA STRUCTURE DES POPULATIONS PATHOGENES .....</b>  | <br><b>84</b>  |
| <b>ARTICLE: Is there a trade-off between aggressiveness and over-winter survival in <i>Phytophthora infestans</i>? .....</b>   | <b>86</b>      |
| <b>A. Introduction .....</b>   | <b>87</b>      |
| <b>B. Materials and methods .....</b>  | <b>89</b>      |
| B.1. <i>Phytophthora infestans</i> isolates .....  | 89             |
| B.2. Assessing foliar aggressiveness .....   | 90             |
| B.3. Survival experiment .....   | 91             |
| <b>C. Results .....</b>  | <b>93</b>      |
| C.1. Winter characteristics .....  | 93             |
| C.2. Sprouting during winter .....   | 94             |
| C.3. Tuber survival .....  | 94             |
| <b>D. Discussion .....</b>   | <b>96</b>      |
| D.1. Tuber survival and pathogen transmission .....  | 96             |
| D.2. Direct and indirect effects of infection on tuber survival .....  | 97             |
| D.3. Consequences of survival for aggressiveness evolution .....   | 98             |
| <b>E. Acknowledgements .....</b>   | <b>99</b>      |
| <b>F. References .....</b>   | <b>99</b>      |
| <br><b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>   | <br><b>104</b> |
| <b>A. Structuration par l'hôte des populations pathogènes .....</b>  | <b>105</b>     |
| A.1. Structuration des populations pathogènes pour la virulence .....  | 105            |
| A.2. Structuration des populations pathogènes pour l'agressivité .....   | 106            |
| A.3. Structuration génotypique des populations pathogènes .....  | 111            |
| <b>B. Agressivité et mode de reproduction des populations pathogènes .....</b>   | <b>114</b>     |
| <b>C. Agressivité et capacité de survie des populations pathogènes .....</b>   | <b>117</b>     |
| <b>D. Gestion durable des résistances des plantes aux maladies .....</b>   | <b>121</b>     |
| D.1. Conséquences des connaissances acquises pour la gestion des résistances .....   | 121            |
| D.2. Limites actuelles et apports de la modélisation .....   | 123            |
| <br><b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>   | <br><b>125</b> |
| <br><b>ANNEXE I : Adaptation of <i>Phytophthora infestans</i> to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations</b>                         |                |
| <br><b>ANNEXE II : Les souches A2 de l'agent du mildiou <i>Phytophthora infestans</i> sont plus "récentes" en France que les A1... Mais sont-elles plus agressives ?</b> |                |





# *Chapitre 1*

## *Introduction générale*

## INTRODUCTION GENERALE

Cette thèse de phytopathologie a été réalisée dans l'équipe « Caractérisation et gestion durable des résistances des plantes aux maladies » de l'UMR BiO3P de l'INRA de Rennes. La durabilité des résistances des plantes aux maladies dépend du potentiel d'évolution des populations pathogènes. C'est pourquoi ce travail de thèse fait appel à des concepts de biologie évolutive pour décrire et comprendre la réponse adaptative des populations d'agents pathogènes au déploiement en culture d'hôtes végétaux.

L'introduction générale de ce mémoire de thèse sera découpée en trois synthèses bibliographiques : la première traitera de la durabilité des résistances des plantes, la seconde s'intéressera à la coévolution dans les systèmes hôtes-parasites, et la troisième présentera le couple *Phytophthora infestans* – *Solanum tuberosum* qui a été choisi ici pour décrire et comprendre la capacité d'adaptation des populations pathogènes aux résistances des plantes déployées en culture. Cette partie introductive se terminera par la présentation des objectifs de ce travail de thèse.

## A. Durabilité des résistances des plantes

Les maladies des plantes occasionnent encore aujourd'hui des pertes économiques importantes ; c'est pourquoi la protection des cultures contre les agents pathogènes est d'une importance majeure. Dans les pays industrialisés, ces pertes s'élèvent à près de 40% et concernent toutes les étapes de la chaîne alimentaire, depuis la production jusqu'à la transformation industrielle et la commercialisation. Leur niveau est bien plus élevé encore dans les pays en développement (Lepoivre, 2003). Toutes les cultures sont endommagées si elles ne sont pas protégées contre leurs agents pathogènes.

Les produits de l'industrie chimique ont apporté des solutions rapides, générales, simples et efficaces aux problèmes de protection des cultures. La France est d'ailleurs aujourd'hui le troisième consommateur mondial de pesticides (Aubertot *et al.*, 2005). Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont toutefois abordé les effets nocifs de l'emploi des pesticides sur la santé des utilisateurs et sur l'environnement. Ainsi, une étude conclut à une augmentation significative du nombre de cancers du rein et du pancréas chez les agriculteurs français ayant été exposés régulièrement aux pesticides (Viel & Richardson, 1993). Plus récemment, le rôle aggravant de l'exposition professionnelle aux pesticides dans la survenue de la maladie de Parkinson a été mis en évidence (Elbaz *et al.*, 2004 ; Galanaud *et al.*, 2005). De même, l'impact des pesticides sur la pollution des sols et des nappes phréatiques, la réduction de la biodiversité, la destruction des ennemis naturels des bio-agresseurs ou l'apparition de souches de parasites résistantes ont été maintes fois documentées (Savary & Teng, 1994). Aussi cherchons-nous aujourd'hui à privilégier les moyens de protection respectueux des ressources naturelles et à utiliser les pesticides d'une façon « raisonnée » car dans la pratique, les quantités utilisées et les fréquences d'application sont, malgré les efforts réalisés ces dernières années, très souvent plus importantes que nécessaires (Hogenboom, 1993 ; Aubertot *et al.*, 2005).

La création de variétés qui résistent aux parasites est un moyen de limiter l'utilisation des pesticides et donc leurs effets néfastes sur les producteurs, les consommateurs et l'environnement. Elle pose néanmoins un problème similaire à celui de l'emploi des pesticides : là aussi, l'expérience montre que les agents pathogènes peuvent se révéler, à terme, capables de contourner les résistances introduites dans ces variétés. Dans la pratique, une résistance est considérée comme durable si elle a conservé son efficacité après avoir été utilisée de manière prolongée sur de grandes surfaces en présence de l'agent pathogène

(Johnson, 1984). Cette durabilité des résistances est hautement variable, et le temps d'efficacité nécessaire pour considérer une résistance durable dépend de la durée d'un cycle de sélection de la plante concernée (Linde *et al.*, 2002). Afin que l'utilisation des variétés résistantes soit plus efficace, il est nécessaire de trouver des moyens pour rendre les résistances durables, ce qui suppose de comprendre les modalités d'adaptation<sup>1</sup> des populations<sup>2</sup> d'agents pathogènes.

### A.1. Résistance des plantes

#### *a. Définition de la résistance*

Tout phénomène qui, chez un végétal, interdit ou limite le développement d'un parasite est appelé résistance. Cette propriété, propre à un couple hôte-parasite, se traduit par un effet mesurable au niveau de la maladie et/ou de l'épidémie<sup>3</sup> (Rapilly, 1991).

L'évitement est une forme particulière de résistance définie comme la stratégie qui empêche le contact cellulaire entre l'hôte et l'agent pathogène. Par exemple, certaines variétés de blé et d'orge, dont les fleurs restent fermées jusqu'à ce que la pollinisation se produise, évitent leur infection par les spores<sup>4</sup> du champignon *Claviceps purpurea* responsable de l'ergot sur les inflorescences des céréales (Russell, 1978). La tolérance n'est pas une forme de résistance telle que définie ci-dessus ; elle correspond à la capacité d'une plante à subir une maladie sans que celle-ci n'affecte le rendement ou la qualité de cette plante (Schafer, 1971 ; Parlevliet, 1979). Une variété tolérante a un plus grand rendement qu'une variété sensible lorsque ces deux variétés sont touchées dans les mêmes proportions par une maladie (Russell, 1978).

---

<sup>1</sup> **Adaptation** : Mécanisme qui mène à l'acquisition par un organisme d'un caractère qui lui permet de survivre et de se reproduire dans son milieu mieux que s'il en était dépourvu.

<sup>2</sup> **Population** : Ensemble d'individus appartenant à la même espèce, susceptibles de se reproduire entre eux, occupant une aire géographique commune plus ou moins définie et jouant un rôle particulier dans un écosystème.

<sup>3</sup> **Epidémie** : Expansion démographique d'une population de parasites ; par opposition, l'**endémie** est définie par la stabilité des effectifs du parasite dans la population hôte.

<sup>4</sup> **Spore** : Propagule représentant l'unité de propagation d'un champignon.

On distingue les résistances hôtes et les résistances non-hôtes. Chaque parasite est capable d'attaquer une gamme d'hôte, qui peut être plus ou moins large ; en revanche tous les individus des espèces « non-hôtes » sont résistants à tous les organismes « non-parasites » (Talboy *et al.*, 1973). Si, par exemple, la gamme d'hôte d'un agent pathogène correspond à une famille d'espèces végétales, l'ensemble des espèces des autres familles végétales, et de même l'ensemble des espèces des autres règnes, seront des non-hôtes de cet agent pathogène. *A contrario*, on parle de résistance hôte lorsque la plante appartient à la gamme d'hôte du parasite. Il y a deux types de résistance hôte : la résistance race-spécifique qui n'est active que face à certains génotypes<sup>5</sup> du parasite, et la résistance race non-spécifique qui fonctionne vis-à-vis de l'ensemble des génotypes du parasite (Robinson, 1969).

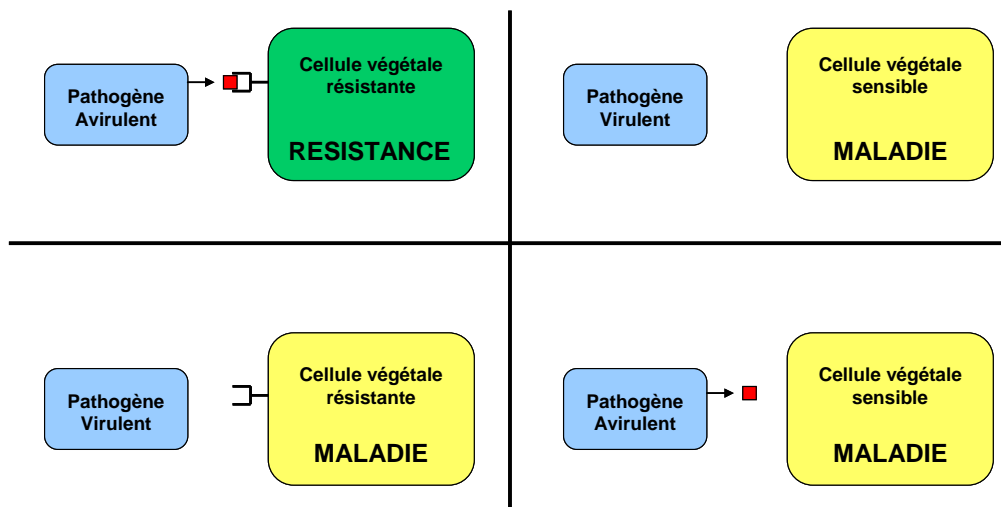
#### *b. Résistance race spécifique*

Ce type de résistance, qualifiée par Van der Plank (1963) de verticale, est caractérisé par une interaction différentielle entre les génotypes de l'hôte et de l'agent pathogène. C'est une résistance totale : elle ne permet pas le développement de la maladie et empêche la multiplication du parasite (Parlevliet, 1979). Les résistances spécifiques sont mono- ou oligogéniques et les gènes responsables, appelés gènes majeurs de résistance (ou gènes R), sont impliqués dans la reconnaissance entre la plante et l'agent pathogène. Flor (1956, 1971) a montré chez le pathosystème lin (*Linum marginale*) – rouille du lin (*Melampsora lini*) qu'il y avait une interaction spécifique entre l'hôte et l'agent pathogène : à chaque gène R qui conditionne la résistance chez l'hôte correspond un gène d'avirulence conditionnant le pouvoir pathogène chez le parasite. Cette relation « gène-pour-gène » a depuis été démontrée dans de nombreuses autres combinaisons hôtes-parasites. Les mécanismes de résistance spécifique sont induits par la reconnaissance entre les produits des gènes d'avirulence de l'agent pathogène et des protéines réceptrices de l'hôte codées par les gènes majeurs de résistance (Hammond-Kosack & Jones, 1997). On peut assimiler les molécules d'avirulence à des « antigènes » qui auraient une fonction propre dans la biologie du parasite mais qui, en contact avec les produits des gènes de résistance, induiraient une cascade d'événements biochimiques aboutissant à la résistance (Dron *et al.*, 1995). Pour qu'il y ait résistance, il faut que l'hôte ait le gène de résistance qui code un récepteur capable de reconnaître le produit du gène d'avirulence correspondant de l'agent pathogène. Dans tous les autres cas l'agent pathogène provoque la maladie (Fig. 1-1). C'est une réponse de type « tout ou rien » :

---

<sup>5</sup> **Génotype** : Ensemble de l'information génétique que possède un individu.

l'efficacité d'infection est maximale lorsque l'agent pathogène est virulent, ou bien nulle lorsqu'il est avirulent. Les gènes de résistance majeurs, en présence d'un parasite possédant le gène d'avirulence correspondant, déclenchent chez la plante une réaction d'hypersensibilité qui limite la destruction des tissus à la mort de quelques cellules autour du point de pénétration du parasite (Rapilly, 1991). Lorsqu'une plante a développé une réaction d'hypersensibilité, elle devient, pour une certaine période de temps, plus résistante à des attaques ultérieures, ce phénomène est appelé résistance systémique acquise ou SAR (Heller *et al.*, 2000).



**Figure 1-1 :** Schématisation de la relation gène-pour-gène qui conditionne la résistance spécifique des plantes aux maladies. La réaction est incompatible (résistance) seulement quand la plante qui a un gène R reconnaît le pathogène qui a le gène d'avirulence correspondant. Pour toutes les autres combinaisons, l'hôte ne reconnaît pas le pathogène et il en résulte une interaction compatible (maladie). D'après Staskawicz *et al.* (1995).

C'est à partir du modèle *Solanum tuberosum* – *Phytophthora infestans* que Van der Plank (1968) a expliqué l'effet de la résistance verticale. La règle générale est qu'une telle résistance retarde le départ d'une épidémie en diminuant la quantité d'inoculum initial. Considérons deux champs de pomme de terre hypothétiques, l'un avec une variété sans gène R et l'autre avec une variété possédant le gène majeur R1. Ces deux champs subissent de petites averses de spores. Supposons que 99% de ces spores ne peuvent pas infecter les plantes possédant R1 ; elles ne peuvent donc attaquer que le champ qui n'a pas de résistance verticale. Les spores restantes (1%) peuvent infecter les plantes possédant R1 ; elles sont donc capables d'attaquer les deux champs. Dans ces conditions, la variété dépourvue du gène R1 démarre avec 100 fois plus d'inoculum actif que la variété possédant R1. Ainsi le nombre

initial de lésions<sup>6</sup> est 100 fois plus grand dans le champ avec les plantes sensibles. La résistance verticale réduit l'inoculum initial au 1/100 ; toutefois, lorsque l'épidémie commence, elle progresse aussi rapidement dans le champ pourvu du gène R1 que dans celui qui en est dépourvu. En raison de la moindre quantité d'inoculum initial, l'épidémie est retardée dans le champ pourvu du gène R1 pendant la durée nécessaire à la maladie pour se multiplier par 100. Cette forme de résistance a donc un grand intérêt si elle retarde le début de l'attaque jusqu'à une date où le cycle de végétation des plantes est très avancé. Ainsi une variété possédant un gène majeur de résistance peu utilisé peut présenter un comportement satisfaisant, alors que d'autres variétés possédant un gène majeur de résistance très utilisé seront pratiquement aussi sensibles que des variétés dépourvues de gènes R car l'inoculum survivant à l'hiver dans les tubercules de ces variétés appartient à des races virulentes face à ce gène de résistance. Van der Plank (1968) appelle ceci « le prix de la popularité d'une variété ». La principale cause de multiplication des races virulentes est la plantation sur des grandes surfaces de variétés résistantes.

Bien qu'il y ait quelques rares exemples de résistances totales durables, comme la résistance monogénique du chou à *Fusarium oxysporum* qui fut stable pendant plus de 90 ans (Vera Cruz *et al.*, 2000), des exemples de contournement rapide de ces résistances ont souvent été rapportés et sont bien plus nombreux : le gène Yr17 de résistance à la rouille jaune du blé fût contourné en deux ou trois saisons (Bayles *et al.*, 2000), le gène Vf de résistance à la tavelure du pommier fût également contourné en quelques saisons (Guérin & Le Cam, 2004), et plusieurs gènes de résistance à la pyriculariose du riz n'ont été efficaces que moins de trois années (Kiyosawa, 1982 ; Zeigler *et al.*, 1994). Il est donc généralement admis que les résistances race spécifiques ne sont pas durables.

### *c. Résistance race non-spécifique*

Dans ce type de résistance, qualifiée par Van der Plank (1963) d'horizontale, il n'y a pas d'interaction spécifique entre les génotypes de l'hôte et de l'agent pathogène. Il s'agit en général d'une résistance partielle : elle ne permet pas de bloquer entièrement le cycle de développement du parasite (Parlevliet, 1979). Les résistances race non-spécifiques sont le plus souvent polygéniques (Schiff *et al.*, 2001) : elles sont gouvernées par plusieurs gènes, appelés gènes mineurs de résistance, ou QTL de résistance (Quantitative Trait Loci). Cette résistance ne se traduit pas par une réponse qualitative binaire, mais par une réponse

---

<sup>6</sup> **Lésion** : Zone d'altération de tissus végétaux.



quantitative correspondant à un ralentissement du développement de l'épidémie dans la culture. Elle porte en particulier sur la pénétration et la dissémination du parasite dans les tissus, l'intensité de la sporulation et la période de latence<sup>7</sup> entre deux cycles successifs de contamination. Deux variétés pourvues de résistances partielles peuvent avoir des niveaux de résistance très différents, mais leur sensibilité relative est la même face à l'ensemble des pathotypes<sup>8</sup>.

Van der Plank (1968) a également utilisé comme exemple le couple *Solanum tuberosum* – *Phytophthora infestans* pour expliquer l'effet de la résistance horizontale. Tandis que la résistance verticale retarde le départ des épidémies, la résistance horizontale les ralentit une fois qu'elles ont commencé. Le mildiou est observé pour la première fois à peu près au même moment pour les variétés sensibles et les variétés avec une résistance horizontale ; mais la maladie se développe plus rapidement sur les variétés sensibles que sur les variétés partiellement résistantes. La résistance horizontale, en réduisant l'infection du feuillage et des tubercules, peut réduire l'inoculum survivant à l'hiver dans les tubercules malades, et ainsi retarder légèrement le départ de l'épidémie pour la saison suivante. Notons qu'en additionnant les résistances spécifiques et non-spécifiques dans une même variété, le départ de l'épidémie est retardé et sa vitesse est ralentie.

Il est généralement admis que les résistances non-spécifiques sont durables. Contrairement à une résistance totale, pour laquelle nous pouvons facilement concevoir qu'une simple mutation du gène d'avirulence peut permettre le contournement de la résistance, l'adaptation à une résistance partielle est plus difficile pour les populations parasitaires. Compte tenu du grand nombre de gènes et donc du grand nombre de facteurs susceptibles de déterminer cette résistance, il existe sûrement de nombreux mécanismes impliqués dans l'adaptation graduelle du parasite et la perte progressive (appelé érosion) de la résistance partielle. Cette érosion est beaucoup plus lente que le contournement d'une résistance totale, du fait de la multiplicité des facteurs en cause. Notons que, par son caractère durable, la résistance partielle est très intéressante, mais son déterminisme polygénique la rend beaucoup plus compliquée à sélectionner que la résistance totale (Parlevliet & Van Ommeren, 1975).

<sup>7</sup> **Période de latence** : Période qui sépare l'infection de l'apparition des propagules infectieuses.

<sup>8</sup> Le terme « **pathotype** » est synonyme de « **biotype** » ou encore de « **race physiologique** », et désigne une entité génétique d'un agent pathogène définie par son profil de virulence.

## A.2. Pouvoir pathogène des parasites

Le pouvoir pathogène, ou pathogénicité, est un terme général qui inclut une composante qualitative binaire et une composante quantitative (Watson, 1970). La terminologie utilisée pour décrire l'effet des parasites sur la fitness<sup>9</sup> des hôtes peut porter à confusion car les phytopathologistes et les biologistes de l'évolution ont utilisé des définitions différentes pour le même terme (Poulin & Combes, 1999). En phytopathologie, la « virulence » est relative à l'interaction gène-pour-gène. Ainsi, la sévérité des symptômes et/ou l'effet de l'infection sur la fitness de l'hôte ne sont pas prédits par la virulence. Alors qu'en biologie évolutive, le terme « virulence » désigne la sévérité de symptôme, qui est supposée être reliée à la réduction de fitness de l'hôte, et la composante qualitative est appelée « infectivité » (Thomas & Elkinton, 2004). Nous utiliserons ici le terme d'« agressivité » pour désigner la composante quantitative du pouvoir pathogène, et le terme de « virulence » pour désigner sa composante qualitative. Cet usage est similaire à celui utilisé par Brasier (1990) dans sa description des races agressives et non-agressives du pathogène de l'orme *Ophiostoma ulmi*.

### *a. Virulence*

La virulence est la composante qualitative du pouvoir pathogène : elle définit la capacité du parasite à attaquer, après reconnaissance, un hôte donné. La virulence varie par « tout ou rien » et est généralement associée à des résistances spécifiques. Chez tous les parasites qui suivent un système simple et démontrable de relation gène-pour-gène, on peut affirmer que la virulence est transmise oligogéniquement à la descendance, bien qu'il existe de rares cas de virulence à hérédité polygénique (Person, 1966). Le pathotype d'une souche correspond à son spectre de virulence déterminé sur une gamme d'hôtes différentielle.

### *b. Agressivité*

L'agressivité est la composante quantitative du pouvoir pathogène ; elle ne s'exprime que si le parasite est virulent. L'agressivité varie en continu : c'est une mesure de la quantité de symptômes (donc de la gravité de la maladie) causée par une souche donnée. Une forte agressivité peut se traduire par une apparition plus rapide de la maladie, et/ou un taux de reproduction du parasite plus élevé. Si deux races virulentes d'un agent pathogène induisent

---

<sup>9</sup> **Fitness** : Capacité d'un individu à survivre et à se reproduire.

des niveaux de gravité de maladie différents sur une même plante hôte, alors ces races diffèrent par leur agressivité. Il y a un lien direct entre la résistance horizontale et l'agressivité ; il n'y a pas de différence entre les effets d'une résistance horizontale accrue et ceux d'une agressivité réduite. Quand une plante est faiblement attaquée dans un environnement favorable à la maladie, on ne peut pas savoir *a priori* si la faiblesse de l'attaque résulte d'une forte résistance horizontale de la variété ou d'une faible agressivité du pathogène. L'agressivité est, elle, toujours polygénique, et les différences entre isolats sont quantitatives.

### *c. Corrélation négative entre virulence et agressivité*

Van der Plank (1969) fait état d'une absence de corrélation positive connue entre la virulence et l'agressivité, mais on peut trouver une corrélation négative : une virulence accrue peut aller de paire avec une agressivité réduite. C'est ce qu'on appelle le coût de la virulence. Quand le pathogène acquiert le pouvoir d'attaquer un hôte ayant un gène majeur de résistance, il l'acquiert parfois au prix de perdre un peu de son aptitude à survivre sur des hôtes dépourvus de ce gène. Flor (1953) trouva, en étudiant la rouille du lin (*Melampsora lini*), que l'aptitude d'une race à survivre était réduite si elle avait une virulence plus grande que nécessaire. Watson (1958) montra la même chose pour *Puccinia graminis* sur le blé. Et, par des expériences de compétition entre races d'*Erysiphe graminis* sur le blé, Bronson & Ellingboe (1986) ont trouvé qu'une race virulente était approximativement 24% moins vigoureuse qu'une race avirulente. Ce mécanisme n'est pas pour autant généralisable, il n'existe pas pour tous les gènes d'avirulence (Leach *et al.*, 2001).

Les gènes d'avirulence sont à l'origine définis par leur impact négatif sur la capacité des pathogènes à infecter leurs hôtes. Mais la caractérisation de nombreux gènes d'avirulence de bactéries et de champignons a révélé qu'ils codaient un étonnant assortiment de protéines et qu'ils appartenaient à plusieurs familles de gènes (White *et al.*, 2000 ; Luderer & Joosten, 2001). Et la fonction première du produit d'un gène d'avirulence n'est pas d'être reconnue par le produit d'un gène de résistance mais sa participation à de nombreux mécanismes de la biologie du pathogène (Vera Cruz *et al.*, 2000). La mutation d'un gène d'avirulence peut donc avoir un coût pour l'agent pathogène. L'inactivation ou la baisse de fonction de ce gène a des conséquences néfastes sur la biologie du pathogène et plus particulièrement sur sa fitness si le gène d'avirulence muté était impliqué dans la fitness (Leach *et al.*, 2001). Une telle mutation rend le pathogène virulent, car le récepteur codé par le gène de résistance de la plante hôte ne reconnaît plus le pathogène, mais ce passage de l'avirulence à la virulence a un coût qui peut

être plus ou moins important selon la fonction première du produit du gène d'avirulence. Si le coût est nul, alors les races virulentes (avirulents mutés) seront sélectionnées dès que le gène de résistance sera utilisé en culture ; en revanche, si le coût est fort (ce qui est a priori le cas quand le gène d'avirulence est impliqué dans une fonction indispensable à la survie du pathogène) alors les races virulentes seront contre-sélectionnées et disparaîtront de la population de l'agent pathogène si le gène de résistance n'est pas employé.

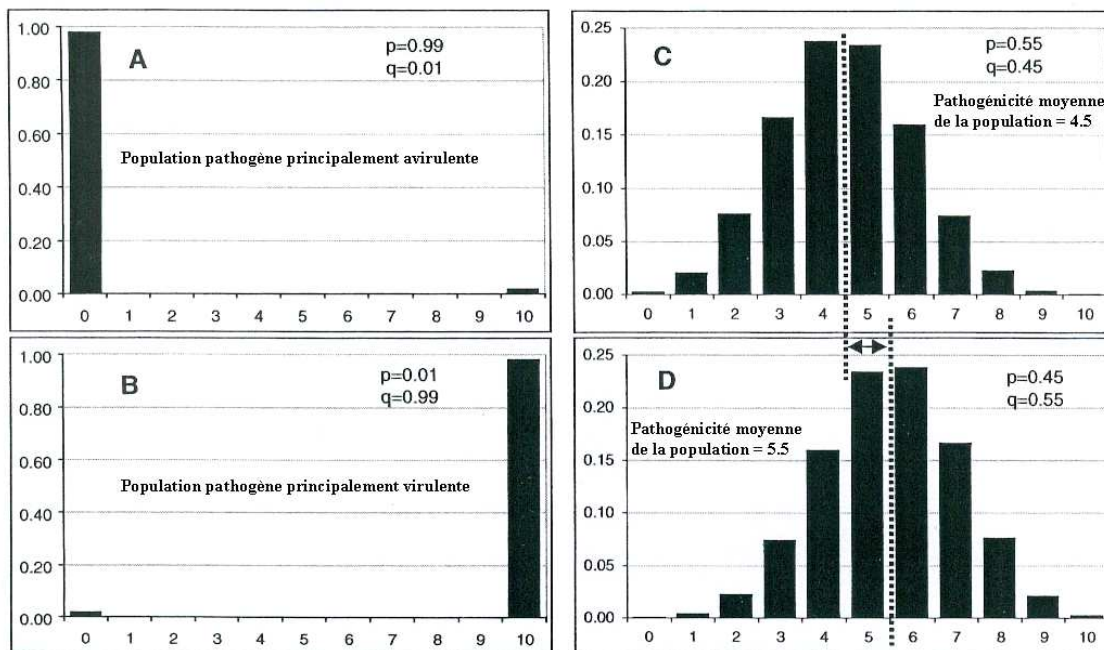
### A.3. Contournement et érosion

#### *a. Contournement des résistances totales*

Les nombreux exemples de contournement rapide de gènes majeurs de résistance (Gallais, 1990) offrent des preuves que la sélection des agents pathogènes est particulièrement efficace dans les agroécosystèmes basés sur la monoculture et l'uniformité génétique (McDonald & Linde, 2002). Une monoculture d'une variété présentant une résistance totale sélectionne, parmi la diversité génétique de la population d'agents pathogènes, les races virulentes. La sélection imposée par une résistance totale est disruptive, elle amène à un changement de fréquence entre les races virulentes et les races avirulentes. La fréquence des mutants virulents, qui n'étant pas reconnus par la plante hôte peuvent se multiplier, augmente, alors que la fréquence des avirulents, qui provoquent chez la plante hôte une réaction d'hypersensibilité, diminue (Fig. 1-2A et 1-2B). C'est ainsi que l'épidémie, qui commence avec un décalage dans le temps, se développe à la même vitesse sur la variété avec une résistance totale que sur la variété sensible. De saison en saison, ce décalage dans le temps diminue avec l'augmentation en fréquence des races virulentes, et le début de l'épidémie se rapproche de plus en plus de celui observé sur une variété sensible. Le contournement des résistances totales est assez rapide : quelques années suffisent aux parasites pour surmonter entièrement des résistances jusqu'alors très efficaces (Johnson, 1979). La non-durabilité de ce type de résistance oblige, lorsque le gène majeur de résistance est contourné, à remplacer la variété devenue sensible par une variété possédant un autre gène majeur de résistance. Il s'ensuit une succession de succès et d'échecs (en anglais on parle de « boom and bust cycle ») des gènes majeurs de résistance (Pink, 2002). Le contournement des résistances totales n'est pas équivalent dans tous les pathosystèmes<sup>10</sup>. Par exemple, la taille des parcelles joue sur

<sup>10</sup> **Pathosystème** : Désigne le complexe plante-pathogène-environnement.

l'intensité de la pression de sélection exercée par les gènes majeurs de résistance. Dans les champs de petite taille, le problème du contournement de la résistance est plus faible que dans les champs de grande taille qui imposent une pression de sélection plus forte (Parlevliet, 1993). D'autre part, le coût de la virulence s'oppose à la sélection exercée par les hôtes résistants. Ce coût étant très variable selon la fonction du produit du gène d'avirulence, il est facile de comprendre que l'équilibre entre le coût de la virulence et la sélection exercée par les plantes résistantes est propre à chaque pathosystème.



**Figure 1-2 : Changements dans les populations de pathogènes associés au contournement d'une résistance totale (A et B) et à l'érosion d'une résistance partielle (C et D). D'après McDonald & Linde (2002).**

**A et B :** lors du contournement d'une résistance totale, les changements du pouvoir pathogène concernent l'avirulence et la virulence ; la population pathogène passe rapidement de l'avirulence à la virulence. **p** et **q** représentent les fréquences des allèles d'avirulence et de virulence, respectivement, dans la population pathogène.

**C et D :** lors de l'érosion d'une résistance partielle, les changements du pouvoir pathogène concernent l'agressivité ; la population pathogène gagne progressivement en agressivité.

### *b. Erosion des résistances partielles*

Pour surmonter une résistance totale, l'agent pathogène, susceptible de subir un coût de virulence, peut devenir moins agressif sur les variétés sensibles, alors que pour surmonter une résistance partielle, le pathogène doit au contraire devenir plus agressif même sur les variétés sensibles (Van der Plank, 1968). L'évolution des populations d'agents pathogènes

dans une culture partiellement résistante étant très différente de celle face à une résistance totale, on ne parle plus de contournement mais d'érosion de la résistance (Watson, 1970). La pression de sélection exercée par une résistance partielle est directionnelle, elle conduit à une augmentation progressive de la fréquence des individus avec une forte agressivité dans la population pathogène (Fig. 1-2C et 1-2D). Un nombre important de facteurs est en cause, car la résistance partielle de l'hôte et l'agressivité du pathogène sont toutes deux contrôlées par un ensemble de gènes. L'érosion est donc graduelle et lente. Lehman & Shaner (1996) ont étudié l'évolution d'une composante de l'agressivité de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* sur des variétés de blé partiellement résistantes. Ils ont suivi la durée de la période de latence, facteur de l'agressivité fortement impliqué dans la fitness chez ce parasite strictement biotrophe. Leurs résultats montrent que la pression de sélection exercée par les variétés partiellement résistantes favorise les pathogènes présentant une période de latence courte, ce qui permet au pathogène de surmonter une portion de la résistance partielle. Toutefois, la période de latence n'est qu'un facteur parmi d'autres impliqués dans ce type de résistance. Nous pouvons voir ici un paradoxe : il est admis que la résistance partielle est stable, et ce malgré le fait qu'elle sélectionne les souches les plus agressives. Comment se fait-il que n'apparaissent pas des souches hyper-agressives qui surmontent la résistance partielle entièrement ? Nous apporterons des éléments de réponse à cette question dans la synthèse bibliographique suivante traitant de la coévolution dans les systèmes hôtes-parasites.

#### A.4. Stratégies de gestion des résistances

Pour gérer une résistance et la rendre durable, il convient de faire en sorte que les populations d'agents pathogènes n'évoluent pas trop vite vers une virulence ou une agressivité accrue. Pour ce faire, il existe différents moyens de déployer les résistances.

La résistance spécifique peut tout d'abord être utilisée seule : c'est-à-dire placer un gène de résistance par variété et remplacer la variété contournée par une nouvelle avec un autre gène de résistance. C'est une stratégie de diversification dans le temps. Cependant, une telle résistance est rapidement contournée (quelques années) alors que le temps nécessaire pour la création de nouveaux génotypes est souvent très long ; de l'ordre de 10 ans pour les céréales et de 25 ans pour la pomme de terre (Rousselle-Bourgeois & Rousselle, 1996). Dans certains cas, le recyclage des variétés est possible quelques années plus tard, comme dans l'exemple du nématode *Globodera pallida* (Turner & Fleming, 2002), mais ceci n'est pas

applicable à tous les pathosystèmes (Pink, 2002). Une autre alternative est envisageable pour les plantes qui présentent plusieurs cultures dans une même saison (comme le pois d'hiver et le pois de printemps) : on peut alors alterner les gènes majeurs de résistance au cours de la saison. La variété d'hiver a un gène R et celle de printemps en a un autre. Ceci permet de freiner considérablement l'adaptation des populations pathogènes (Pink, 2002).

Une autre stratégie consiste à insérer plusieurs gènes majeurs de résistance dans une même variété. Cette stratégie, appelée le pyramidage de gènes, repose sur le fait que, selon le concept du gène-pour-gène, plus l'hôte contient de gènes R, plus la proportion d'associations hôte-pathogène aboutissant à une réaction de résistance est importante (avec un gène de résistance, 1/4 des associations aboutissent à une réaction de résistance, alors qu'avec deux gènes de résistance c'est 7/16, et ainsi de suite). L'agent pathogène a alors plus de difficultés à contourner toutes ces résistances, d'autant plus que le coût de la virulence se trouve multiplié par le nombre de gènes R introduits dans la plante hôte (Pedersen & Leath, 1988). Le problème de cette stratégie est que lorsqu'une « super race » arrive à s'adapter, elle est virulente face à l'ensemble des gènes majeurs de résistance et ils deviennent alors tous inutilisables d'un seul coup (Modawi *et al.*, 1985).

Il est également possible d'utiliser la résistance non-spécifique seule. Mais celle-ci étant partielle, elle ne fournit généralement pas un niveau de protection de la plante suffisant pour être satisfaisante au plan de la qualité du produit ou du rendement final de la culture. Son utilisation reste donc souvent associée à des traitements fongicides (Ellissèche *et al.*, 1999). Il y a encore de nombreux progrès génétiques à accomplir afin de combiner des niveaux élevés de résistance partielle avec les qualités agronomiques et technologiques que les producteurs recherchent.

Une autre piste consiste à introduire dans des variétés présentant un niveau de résistance partielle satisfaisant des gènes de résistance spécifique. Même si la part spécifique de leur résistance, conférée par ces gènes R, risque de s'effondrer assez rapidement lors de l'utilisation de ces génotypes sur des surfaces importantes, les variétés ainsi créées présentent l'avantage d'une résistance totale au moment de leur création, et devraient conserver une part de leur résistance (du fait de leur niveau de résistance non spécifique) après contournement de leurs gènes R (Ellissèche *et al.*, 1999). Du point de vue épidémiologique, une telle construction est efficace parce qu'elle entraîne un décalage important dans le temps du début de l'épidémie mais aussi une diminution de la vitesse d'évolution de l'épidémie par rapport à une variété sensible.

L'une des possibilités pour améliorer la durabilité des résistances totales est d'utiliser des stratégies de diversification dans le temps, mais une diversification dans l'espace est également possible. Les mélanges de variétés, contenant des plantes résistantes et des plantes sensibles, ont montré leur efficacité pour réduire la propagation épidémique de maladies fongiques, en particulier dans le cas des agents de rouilles et d'oïdium des cultures céréalières (Wolfe, 1985). Cependant, de tels mélanges variétaux (rangs alternés ou mélange au hasard) peuvent poser des problèmes technologiques pour certaines cultures lors de la récolte et/ou lors de la transformation, d'où l'idée d'utiliser des multilignées (mélange de semences de plusieurs lignées qui diffèrent uniquement par leurs gènes de résistance) (Jensen, 1952). Les mélanges variétaux semblent pouvoir être des moyens efficaces de lutte, à condition de choisir la stratégie la mieux adaptée à chaque pathosystème (Mundt *et al.*, 2002). Un autre type de diversification dans l'espace consiste à réaliser une mosaïque à l'échelle d'un ensemble de parcelles, c'est-à-dire de placer des variétés avec des gènes de résistance différents dans les champs contigus (Pink, 2002).

La conception de stratégies de gestion durable des résistances doit prendre en compte la diversité des systèmes de culture et les questions d'acceptabilité et de réglementation pouvant accompagner leur mise en œuvre.



## B. Coévolution dans les systèmes hôtes-parasites

La durabilité d'une résistance dépend de la composition initiale et du potentiel d'évolution des populations pathogènes contre lesquelles joue cette résistance (McDonald & Linde, 2002). L'estimation de la durabilité d'une résistance revient à estimer le temps pendant lequel l'utilisation de cette résistance améliore significativement le rendement par rapport à celui des variétés sensibles, dans un contexte parasitaire et climatique précis. Cela revient à comprendre et déterminer la composition et le potentiel d'évolution des populations parasites. Des progrès significatifs peuvent être faits dans la lutte contre les parasites grâce à la compréhension de leurs modalités d'évolution. La méthode de lutte idéale consiste à prédire les changements dans la biologie des parasites et à mettre en place les mesures les plus adaptées pour lutter, à la fois à court terme (contre la progression des épidémies) et à long terme (contre l'évolution de l'agressivité des populations pathogènes).

En général, le parasite possède l'avantage d'un cycle de vie plus court que celui de son hôte, ce qui lui permet d'assurer plusieurs générations capables de s'adapter à l'hôte. Par contre, la relative fugacité du milieu de vie du parasite lui impose une phase de dispersion pour trouver de nouveaux individus hôtes ; les aléas de cette recherche sont cependant souvent compensés par un fort potentiel reproductif. Les parasites ont donc une stratégie démographique de pionniers facilitant une sélection rapide (Euzet & Combes, 1980).

### B.1. Forces évolutives structurant les populations parasites

McDonald & Linde (2002) présentent cinq facteurs qui interviennent dans l'évolution génétique des populations d'agents pathogènes. La sélection est la force évolutive qui fait varier les fréquences des génotypes dans les populations pathogènes. Alors que les quatre autres facteurs (mutation, recombinaison, migration et dérive génétique) sont des mécanismes créateurs de variabilité.

### *a. Sélection*

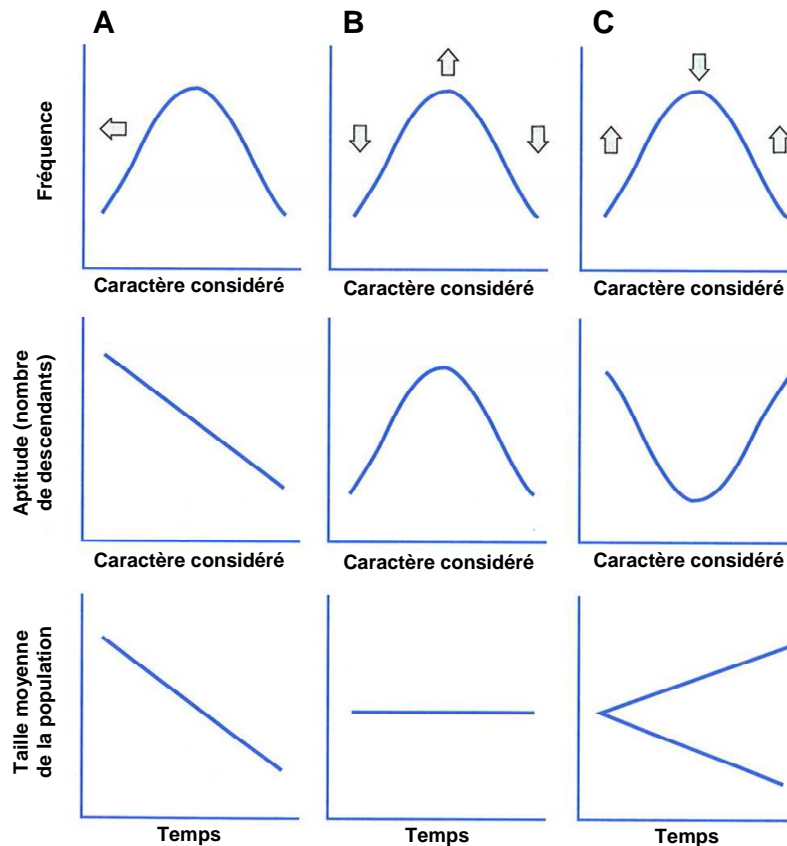
Dès le début du 19<sup>ème</sup> siècle, la biologie comparative et les découvertes de nouveaux organismes et fossiles inconnus engagent progressivement la classification du vivant dans la voie d'un concept transformiste des espèces qui vient s'opposer au fixisme alors de rigueur (Lamarck, 1809). Parmi les mécanismes de transformation proposés, c'est la théorie de la sélection naturelle, développée par Darwin (1859), qui sera retenue. Elle sera progressivement confortée et affinée par les découvertes successives de l'hérédité. L'espèce n'est donc plus définie par un individu type, mais par une population reflétant les variations évolutives. La variabilité naturelle est alors considérée comme un réservoir dans lequel la sélection naturelle puise les individus les mieux adaptés à leur environnement et transforme ainsi, de génération en génération, les populations et les espèces.

La sélection naturelle correspond à une différence de survie et de reproduction qui favorise les individus les mieux adaptés à leur environnement. Elle peut être directionnelle, stabilisante ou disruptive (Fig. 1-3). La sélection directionnelle favorise les individus les mieux adaptés au milieu ; ces phénotypes avantageux ont plus de descendants, ce qui entraîne leur sélection. Par exemple la taille des saumons roses a diminué à partir du moment où les pêcheurs ont été payés au poids et qu'ils ont choisi des filets à grosses mailles (Ricker, 1981). Dans le cas de la sélection stabilisante, les individus les plus adaptés présentent un phénotype moyen, ce qui désavantage les phénotypes extrêmes. Par exemple, avant les progrès de la médecine humaine, les enfants très petits ou très grands survivaient moins bien (Karn & Penrose, 1951) ; aujourd'hui cette sélection se relaxe fortement. Enfin la sélection disruptive favorise au contraire les phénotypes extrêmes par rapport aux phénotypes moyens. Cette sélection est responsable des nombreux exemples de spéciation<sup>11</sup>.

La sélection est l'une des forces évolutives qui fait varier les fréquences alléliques dans les populations pathogènes. Ce mécanisme évolutif permet l'adaptation des agents pathogènes aux conditions locales qu'ils rencontrent (Thrall & Burdon, 2002). Par exemple, les résistances des plantes hôtes, ou l'application de pesticides imposent une sélection directionnelle forte à la population pathogène.

---

<sup>11</sup> **Spéciation** : Processus aboutissant à la formation des espèces. Une espèce se scinde en deux groupes d'organismes, isolés au plan reproductif. Elle se produit à partir de deux populations occupant soit la même aire géographique (**spéciation sympatrique**), soit des aires géographiques différentes (**spéciation allopatrique**), soit des aires géographiques adjacentes, donc distinctes mais contiguës (**spéciation parapatricque**).



**Figure 1-3 : Trois types de sélection : directionnelle (A), stabilisante (B) et disruptive (C).**

Les graphiques de la première ligne montrent la distribution des fréquences du caractère considéré, les flèches indiquant comment la sélection joue sur cette distribution. La seconde ligne montre la relation entre l'aptitude et le caractère considéré pour une génération. La troisième ligne montre le changement probable de la valeur moyenne du caractère considéré, au cours des générations successives. D'après Ridley (1996).

### *b. Mutation*

La mutation est une source de variation amenant directement à des changements de la séquence d'ADN, créant ainsi de nouveaux allèles dans les populations. Les taux de mutation sont généralement faibles (Stubbs, 1985), mais les populations d'agents pathogènes sont souvent de très grande taille, ce qui rend indispensable la considération de ce phénomène de création de variabilité. Par exemple, Wellings & McIntosh (1990) ont montré que les différents pathotypes de rouille jaune (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) présents en Australie dérivait tous d'un ancêtre commun par mutation. En moins de 10 ans, la mutation a permis l'apparition d'une dizaine de nouveaux pathotypes.

### c. Recombinaison

La recombinaison par reproduction sexuée joue souvent un rôle important dans l'adaptation des populations pathogènes en permettant des associations d'allèles. Par exemple, lorsque l'association de plusieurs allèles de virulence est nécessaire à l'infection d'un hôte résistant, la reproduction sexuée est capable de combiner ces allèles apparus indépendamment chez des génotypes pathogènes différents, alors que des agents pathogènes dépourvus de reproduction sexuée ne pourront combiner ces allèles de virulence nécessaires à l'infection que par mutations successives (McDonald & Linde, 2002). De nombreuses études comparant des populations sexuées et asexuées ont montré une diversité en pathotypes plus importante dans les populations sexuées (voir par exemple Martens *et al.*, 1985 chez *Puccinia graminis avenae*, et Andrivon, 1994 chez *Phytophthora infestans*).

### d. Migration

La migration est un phénomène qui participe activement à l'évolution des populations de pathogènes (Brown & Mogens, 2002). Ce flux de génotypes permet l'échange d'individus entre des populations séparées géographiquement. Indépendamment des capacités naturelles de dispersion des agents pathogènes, l'homme est un acteur important dans ce phénomène : il est capable d'emmener beaucoup de pathogènes loin de leurs limites de dispersion naturelle, *via* les pratiques culturales, le commerce et les voyages intercontinentaux.

### e. Dérive génétique

La dérive génétique n'est pas un phénomène directement créateur de variabilité ; elle correspond à une modification aléatoire des fréquences alléliques dans une population, souvent *via* une sévère réduction de la taille de la population de l'agent pathogène. Cette élimination totalement aléatoire d'une partie de la population est par exemple le résultat des conditions climatiques extrêmes annuelles. Ainsi, des populations pathogènes présentant des diminutions régulières de la taille de leur population sont moins diversifiées et moins aptes à s'adapter rapidement que les populations qui présentent une grande taille de population continuellement (McDonald & Linde, 2002).

Wright (1986) a suggéré que les topographies adaptatives<sup>12</sup> présenteraient des « pics » séparés par des « vallées ». La sélection naturelle permet aux populations de gravir ces pics, mais non de traverser les vallées. Il en résulte que les populations peuvent se trouver coincées

---

<sup>12</sup> **Topographie adaptative** : Graphique représentant l'aptitude moyenne d'une population en fonction des fréquences des génotypes ; les pics correspondent aux fréquences pour lesquelles cette aptitude est élevée.

sur des pics locaux, qui ne correspondent pas nécessairement à la meilleure adaptation possible. La dérive génétique pourrait apporter sa contribution à l'évolution des populations en leur permettant d'explorer les fonds des vallées du paysage adaptatif.

## B.2. Evolution de l'agressivité dans les systèmes hôtes-parasites

Les premiers modèles d'évolution de l'agressivité des parasites supposaient que la sélection naturelle doit mener à une diminution de l'agressivité car les parasites dépendent de leurs hôtes (Burnet & White, 1972 ; Browning, 1974 ; Harper, 1977). Cette interprétation a été rejetée par la plupart des évolutionnistes parce qu'elle suppose un mécanisme de sélection de groupe<sup>13</sup> (May & Anderson, 1990). Ménager son hôte constitue, à long terme, un avantage pour le groupe (l'espèce), mais à court terme, chaque individu trouve avantage à se reproduire le plus possible. Nous pouvons donc penser que les avantages à court terme que présente une reproduction maximale l'emporteront sur ceux à long terme, d'une multiplication modérée (Ridley, 1996).

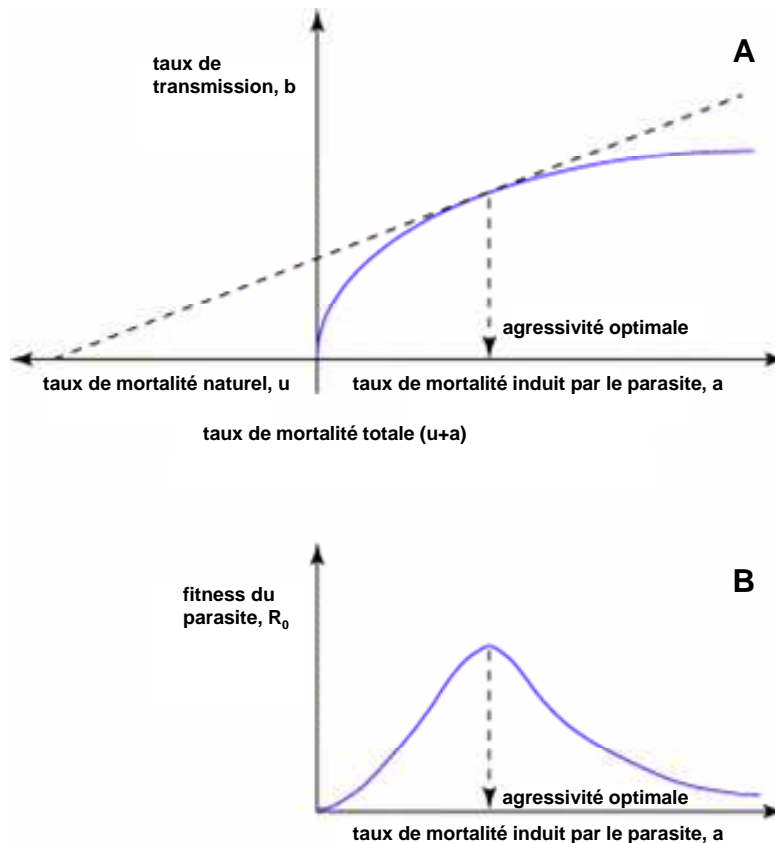
L'évolution pour une moindre agressivité est toutefois observée dans les systèmes où le parasite est étroitement dépendant de l'état de son hôte (Dawkins, 1976). En revanche, pour les parasites capables de quitter leur hôte, comme c'est le cas des ectoparasites, on peut observer des évolutions vers des agressivités extrêmes (Lehman, 1993). Il en est de même pour les parasites dont la dissémination s'affranchit de l'état de santé de l'hôte porteur, soit parce que le cycle est suffisamment rapide soit parce que le taux de multiplication est suffisamment élevé. Les phytoparasites fongiques à dissémination par des spores aériennes entrent dans ces critères : ils se développent au point de beaucoup affaiblir leur hôte végétal, ce qui n'empêche pas la nouvelle génération de spores de coloniser de nouveaux hôtes.

L'agressivité est donc fortement liée à la transmission du parasite. L'augmentation de la fitness du parasite due à la maximisation de la transmission est rapidement balancée par la disparition de l'hôte. L'agressivité doit donc être contrebalancée pour ne pas augmenter sans limite et se stabiliser autour d'une valeur intermédiaire : c'est le modèle du trade-off<sup>14</sup> entre agressivité et transmission (Anderson & May, 1982 ; Frank, 1996 ; Ebert & Bull, 2003) schématisé sur la figure 1-4. Cette corrélation entre agressivité et transmission a été confirmée

<sup>13</sup> **Sélection de groupe** : Sélection qui favorise des caractères avantageux pour des groupes d'individus, plutôt que des caractères avantageux pour ces individus eux-mêmes.

<sup>14</sup> **Trade-off** : Terme emprunté à la langue anglaise pour désigner les compromis évolutifs entre deux traits.

dans plusieurs systèmes hôtes-parasites (Lipsitch & Moxon, 1997). Toutefois, elle n'est pas généralisable à toutes les associations hôtes-parasites (Ebert & Bull, 2003). Par exemple, dans les cas où la transmission a eu lieu avant la mort de l'hôte, la contrainte est relâchée, et l'agressivité peut augmenter (Ebert & Weisser, 1997).



**Figure 1-4 : Modèle du trade-off entre agressivité et transmission. D'après Ebert & Bull (2003).**

**A :** Le modèle suppose une relation décélérante entre le taux de transmission  $b$  et la mortalité induite par le parasite  $a$ .

**B :** Comme la mort prématurée de l'hôte réduit la transmission du parasite, l'efficacité de transmission cumulée  $R_0$  (le nombre total d'infections secondaires produites à partir d'une infection primaire dans une population hôte sensible) d'un parasite est maximale aux niveaux intermédiaires de  $a$ .

Ce modèle s'écrit  $R_0 = b/(u+a)$ , où  $u$  est le taux de mortalité de l'hôte indépendant du parasite.

L'évolution de l'agressivité peut être également contrebalancée par tout paramètre dépendant de l'agressivité et qui peut contraindre l'exploitation future de l'hôte, comme par exemple l'activation des mécanismes de défense de l'hôte (Day, 2003). L'hétérogénéité de l'hôte dans la population peut également amener à une diminution de l'agressivité des parasites (Ebert & Hamilton, 1996), s'il y a un trade-off entre les performances sur des hôtes différents qui maintient l'agressivité moyenne à une valeur intermédiaire (Regoes *et al.*, 2000 ; Ganusov *et al.*, 2002). Ce mécanisme semble actif au moins chez certains champignons phytopathogènes pour lesquels les mélanges variétaux sont des moyens de lutte efficaces (Villaréal & Lannou, 2000).

On retrouve en général de la variabilité pour l'agressivité dans les populations naturelles de parasites, que la diversité génétique des populations pathogènes soit faible (Vera-Cruz *et al.*, 2000) ou forte (Restrepo & Verdier, 1997 ; Peros & Berger, 2003). Les composantes d'agressivité, mesurées par la période de latence ou la taille des lésions, se transmettant de génération en génération, il peut donc y avoir une sélection pour l'agressivité dans les populations parasites (Kolmer & Leonard, 1986 ; Lehman & Shaner, 1997). Ce sont les travaux de Leonard (1969) qui ont montré en premier une augmentation de l'agressivité d'une population naturelle de *Puccinia graminis*, pathogène de l'avoine, en conditions contrôlées. La population de *P. graminis*, partagée en deux lots, a été multipliée pendant huit générations successives en parallèle sur deux variétés d'avoine. Ces travaux ont révélé une augmentation de l'efficacité d'infection sur la variété sur laquelle la population a été multipliée.

### B.3. Adaptation locale

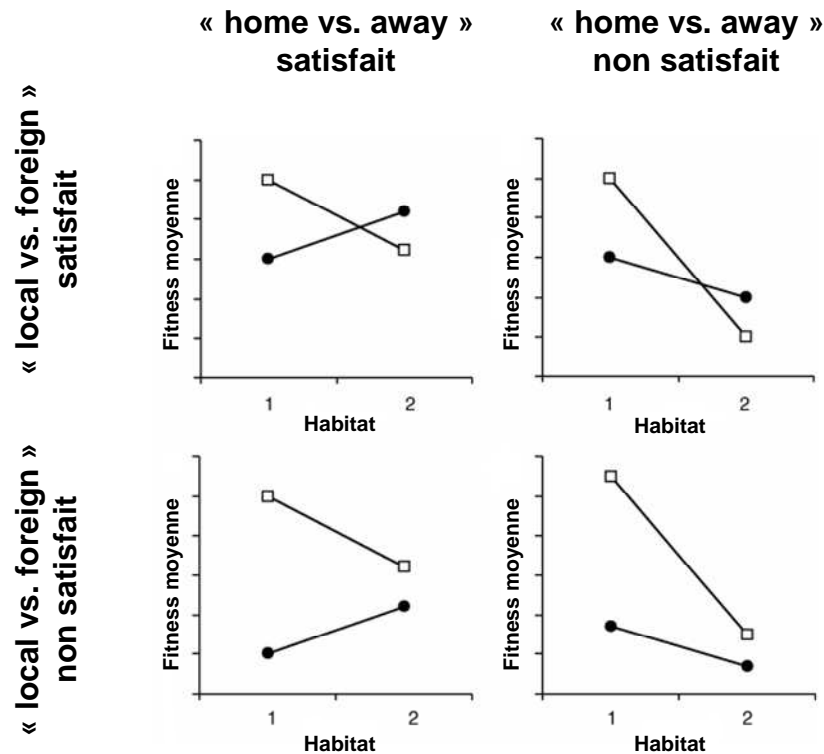
Certains parasites sont plus performants sur l'hôte avec lequel ils ont coévolué (sympatrique) que sur un hôte issu d'une population distante (allopatrique). Ce phénomène a été appelé « adaptation locale ». L'adaptation locale peut être due à un trade-off entre la performance sur la population hôte sympatrique et celle sur les populations hôtes allopatriques, ou à des pressions de sélection hétérogènes entre les populations hôtes (Fry, 1996 ; Kawecki, 1998). Elle est généralement le résultat d'une différence de vitesse d'évolution entre les espèces en interaction. Quand les parasites évoluent plus vite que leurs hôtes, ils ont un avantage évolutif du fait qu'ils suivent les changements évolutifs chez leurs hôtes avec un très faible décalage dans le temps. A l'inverse, quand l'hôte évolue plus vite

que le parasite, ce décalage est plus important (Barrett, 1988). Il est couramment admis que les parasites ont un potentiel évolutif supérieur à celui de leurs hôtes, car ils ont souvent des tailles de populations plus importantes, des temps de génération plus courts et des taux de mutation et de migration plus élevés que leurs hôtes (Hamilton *et al.*, 1990 ; Lively, 1996 ; Kaltz & Shykoff, 1998). Des travaux de modélisation ont montré que l'adaptation locale du parasite dépend des flux de gènes respectifs de l'hôte et du parasite : celui qui a le taux de migration le plus élevé est adapté localement (Gandon *et al.*, 1996 ; Thrall & Burdon, 2002). Notons que l'analyse de structure génétique, permettant l'estimation des flux de gènes, a été grandement facilitée par l'apparition des marqueurs moléculaires neutres (isoenzymes, RFLP, RAPD, AFLP, microsatellites) qui permettent de mesurer le degré de connexion entre populations (Taylor *et al.*, 1999). Une modélisation plus complète (Gandon & Michalakis, 2002) a ensuite montré que l'avantage revenait à celui des deux partenaires qui créait et dispersait le plus vite les nouveautés évolutives, grâce à la combinaison des flux de gènes, de la taille efficace de la population (c'est-à-dire le nombre d'individus contribuant à la génération suivante) et du taux de mutation.

Il faut distinguer processus et patron d'adaptation locale. Le processus d'adaptation locale devrait être testé en comparant les performances des populations adaptées avec celles de leurs ancêtres. Ceci n'étant pas souvent réalisable, le patron d'adaptation locale est testé par des expérimentations d'infection croisées, ou de transplantations réciproques entre les populations hôtes et les populations d'agents pathogènes (Lively, 1996 ; Kaltz & Shykoff, 1998).

Deux critères permettent de tester le patron d'adaptation locale (Fig. 1-5 [Kawecki & Ebert, 2004]) : le premier consiste à comparer la performance d'une population pathogène sur l'hôte sympatrique et sur des hôtes allopatriques (« home vs. away ») et le second à comparer la performance d'une population pathogène sur son hôte sympatrique avec celle d'autres populations pathogènes provenant d'hôtes allopatriques (« local vs. foreign »). Ces deux critères ne sont pas indépendants mais pas non plus équivalents. Le premier met plutôt en évidence un coût d'adaptation alors que le second révèle plutôt des différences dans les pressions de sélection imposées par les différents hôtes.





**Figure 1-5 :** Patrons hypothétiques d'une interaction entre populations hôtes et parasites. Les carrés représentent la fitness de la population parasitaire provenant de l'habitat 1 ; les cercles représentent la fitness de la population parasitaire provenant de l'habitat 2. D'après Kawecki & Ebert (2004).

#### B.4. Coévolution des populations d'hôtes et de parasites en système naturel

Les plantes hôtes sauvages sont distribuées géographiquement telle une mosaïque de sous-populations interconnectées par des flux d'individus migrants (Burdon, 1993a). Cette distribution des plantes hôtes a un impact important sur la subdivision des populations pathogènes. Les pathosystèmes naturels connus possèdent en commun une structure spatio-temporelle de type métapopulation, constituée d'un ensemble de populations isolées géographiquement les unes des autres, mais pouvant échanger des individus par migration (Hanski, 1998). Chaque population, tant les hôtes que les agents pathogènes, possède sa dynamique propre qui peut être marquée par des phases d'extinction et de recolonisation (Harrison & Hasting, 1996). Dans le contexte de populations naturelles en métapopulations, la migration joue un rôle majeur sur l'adaptation. La distribution spatiale des allèles de résistance des plantes-hôtes influence la répartition des allèles de virulence des agents pathogènes et affecte leur capacité d'adaptation locale (Gandon *et al.*, 1996).

La coévolution est un processus amenant des changements adaptatifs réciproques dans des populations d'organismes en interaction, agissant en tant qu'agents sélectifs l'un pour l'autre. Ainsi, tout changement évolutif d'une population influence l'évolution des autres (Janzen, 1980). Cette réciprocité a bien lieu dans les systèmes plantes-pathogènes naturels : une plante qui acquiert, par mutation ou recombinaison, une résistance spécifique sera favorisée et donc sélectionnée ; cette évolution de la population hôte entraîne la sélection des parasites virulents (avirulents mutés) qui deviennent majoritaires, et un nouveau cycle recommence. Dans ces communautés naturelles, les mécanismes de coévolution entre les plantes et les agents pathogènes aboutissent à des situations d'équilibre régulées par les différentes forces évolutives (Gandon *et al.*, 1996).

Pour expliquer que la coévolution en milieu naturel aboutisse à une situation d'équilibre, Van Valen (1973) a formulé l'hypothèse dite « de la Reine Rouge ». C'est un équilibre dynamique : chaque espèce subit sans arrêt une sélection naturelle qui résulte des perfectionnements évolutifs de l'autre partenaire. Pour chaque espèce, les adaptations nouvelles de l'autre constituent une détérioration du milieu biologique. Le nom de cet équilibre se réfère à « Alice au Pays des Merveilles » : la Reine Rouge explique à Alice que dans son pays, « *tu dois courir de toutes tes forces, juste pour rester à la même place* ».

#### B.5. Evolution des populations pathogènes en système agricole

Au sens strict du mot, la coévolution implique des influences réciproques entre espèces. On doit la distinguer de l'évolution séquentielle, dans laquelle l'évolution d'une espèce en influence une autre, sans que la réciproque soit vraie (Ridley, 1996). Jermy (1984) considère, par exemple, que l'évolution des plantes et des insectes est plutôt séquentielle, les plantes influençant l'évolution des insectes, alors que ceux-ci auraient moins d'impact sur l'évolution végétale. Dans les agrosystèmes, l'intervention de l'homme sur les caractéristiques des hôtes (*via* la sélection et le renouvellement variétal) et leurs conséquences sur les agents pathogènes ne permettent pas d'aboutir à des situations stables. Lorsqu'une source de résistance est déployée sur une très large surface, elle exerce une très forte pression de sélection directionnelle, qui devient la principale force affectant les changements de fréquences alléliques dans les populations pathogènes (Hovmoller *et al.*, 1997). La population pathogène évolue en réponse à la résistance de la variété, mais la population hôte ne peut pas répondre naturellement aux changements de fréquence des allèles de virulence qui a lieu dans

la population pathogène, puisqu'elle sera remplacée. La coévolution n'est donc pas vraiment effective dans les agroécosystèmes ; il convient plutôt de parler de sélection séquentielle.

Les systèmes agricoles sont caractérisés par de larges surfaces cultivées où les plantes hôtes présentent des génotypes souvent identiques. De tels systèmes diffèrent beaucoup des conditions naturelles : la diversité génétique des plantes hôtes est très limitée, les populations hôtes et pathogènes peuvent être de très grande taille, et la migration des agents pathogènes est souvent favorisée par rapport à celles des hôtes. Dans ces populations de grande taille, l'apparition d'individus mutants est favorisée, alors que la dérive est limitée, ce qui permet de maintenir un niveau de diversité génétique élevé et favorise ainsi la probabilité d'apparition de combinaisons d'allèles par recombinaison. Néanmoins, chez les parasites obligatoires hétérothalliques<sup>15</sup>, la recombinaison ne se produit que pour des agents pathogènes possédant tous les deux les allèles nécessaires à l'infection de telle sorte que la recombinaison se produit toujours en absence de sélection sur les allèles de virulence.

Les plantes hôtes cultivées étant statiques du point de vue évolutif en comparaison aux populations pathogènes, et les capacités de migration des agents pathogènes étant supérieures à celles des plantes hôtes, nous pouvons postuler que les populations pathogènes devraient être localement adaptées dans les agroécosystèmes (Gandon *et al.*, 1996).

---

<sup>15</sup> **Hétérothallisme** : Phénomène d'incompatibilité empêchant la plasmogamie entre les gamètes produits par un même **thalle** (appareil végétatif chez les champignons).

## C. *Phytophthora infestans* et la pomme de terre

### C.1. Plante hôte

Originnaire d'Amérique du Sud, la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) (Fig. 1-6) fut introduite en Europe *via* l'Espagne au milieu du XVI<sup>ème</sup> siècle, mais il fallut attendre les efforts de Parmentier à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle pour qu'elle figure dans l'alimentation humaine en France (Spire & Rousselle, 1996). La pomme de terre appartient à la famille des Solanacées. C'est une espèce à multiplication végétative, cultivée pour ses tubercules, organes de réserve et de multiplication riches en substances nutritives, majoritairement glucidiques (amidon).

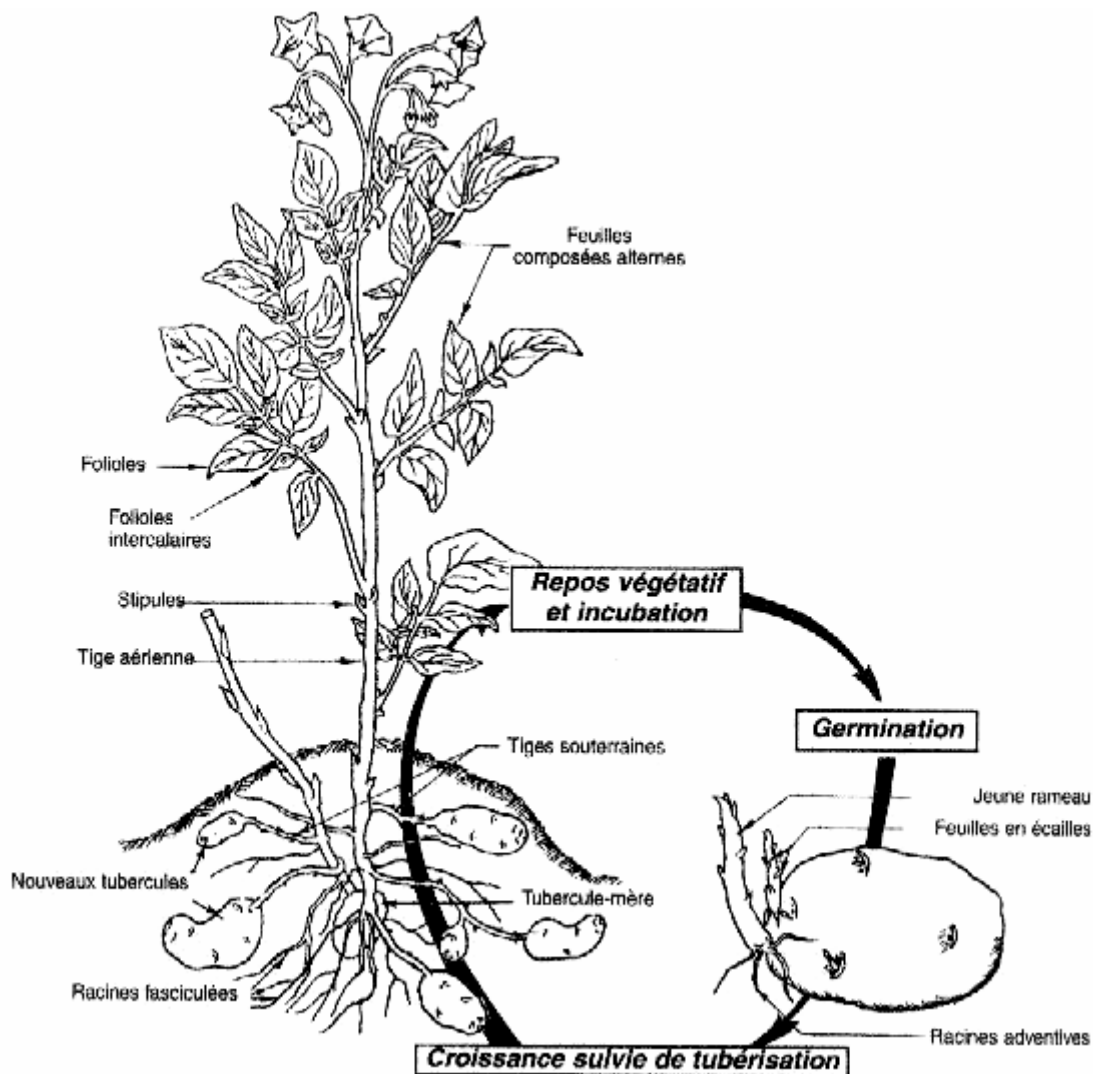
On distingue aujourd'hui trois types de productions : la pomme de terre de consommation (primeurs et conservation), destinée au marché du frais ou à la transformation pour l'alimentation humaine (frites, chips, flocons) ; la pomme de terre féculière, destinée à la transformation industrielle en fécule, aux utilisations multiples (chimie, pharmacie, papeterie, biocarburants...) ; et enfin, la pomme de terre de semence ou plant. Cette culture occupe aujourd'hui, après le blé, le maïs et le riz, le quatrième rang de la production mondiale, avec environ 330 millions de tonnes produites par an. En France, les superficies consacrées à la culture de la pomme de terre couvrent environ 160 000 hectares, pour une production de 7.3 millions de tonnes (données 2004 – FAOSTAT).



**Figure 1-6 : Pomme de terre en culture (Photographie INRA – I. Glais).**

Le cycle annuel de la pomme de terre se déroule en trois phases principales (Fig. 1-7) :

- lorsqu'un tubercule germé est planté en terre, ses germes se transforment en tiges feuillées qui donnent, au dessus du sol, des rameaux, et, au dessous des stolons (Madec, 1966), c'est la phase de croissance ;
- la phase de tubérisation commence par l'arrêt de l'élongation des stolons. Les ébauches des tubercules, une fois différenciés, vont grossir en emmagasinant des substances de réserve, formées à partir des métabolites synthétisés par la plante au niveau du feuillage (Jolivet, 1969). La maturation des tubercules se traduit par un jaunissement du feuillage suivi d'un dessèchement total du système aérien ;
- les tubercules se trouvent dans un état de repos végétatif après la récolte. Durant cette phase, même placés dans des conditions optimales de température et d'humidité, leurs bourgeons sont incapables de croître pour produire des germes (Madec, 1966). A la fin du repos végétatif, le germe entre en croissance s'il n'y a pas de dormance induite par les conditions du milieu.



**Figure 1-7 :** Cycle végétatif de la pomme de terre (D'après Soltner, 1999).

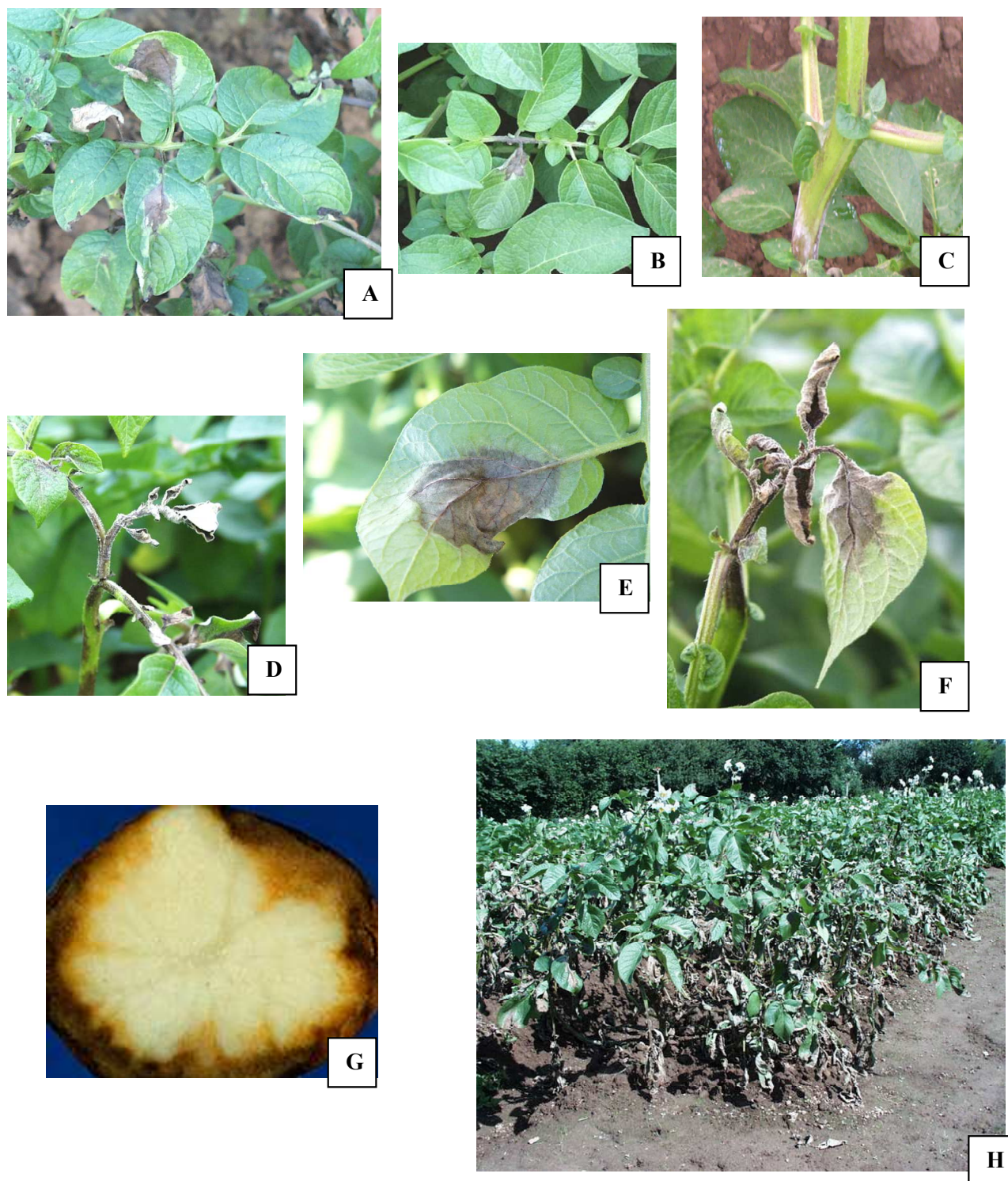
## C.2. Maladie

De nombreux auteurs pensent que le centre d'origine de la maladie serait la vallée de la Toluca au Mexique (Grünwald *et al.*, 2000 ; Grünwald & Flier, 2005), où la diversité des populations de *Phytophthora infestans* est maximale (Niederhauser, 1991). Alors que la première épidémie en Europe remonte à 1845, le mildiou de la pomme de terre est aujourd'hui présent de façon quasi mondiale. L'épidémie démarra en Belgique, puis se propagea, *via* la Suisse, la France et le sud de l'Angleterre, en Irlande où elle provoqua une catastrophe alimentaire sans précédent : entre 1846 et 1851, la famine provoquée par le manque de pomme de terre fit plus d'un million de morts et fit émigrer un autre million d'Irlandais aux USA et au Canada (Woodham-Smith, 1962 ; Hampton, 1992).

Le mildiou est une maladie redoutable. Elle peut toucher tous les organes de la plante : jeunes pousses, feuilles et pétioles, bouquets terminaux, tiges et tubercules (Fig. 1-8). Les pertes de rendement engendrées par cette maladie peuvent atteindre 100% ; en moins de trois semaines une culture de pomme de terre peut être entièrement détruite (Gaucher *et al.*, 1998). Notons que toutes les attaques n'ont pas les mêmes conséquences sur le rendement : les attaques précoces induisent surtout une diminution de la photosynthèse, alors que les attaques tardives conduisent à une baisse de la qualité des tubercules (Radtke & Rieckmann, 1991).

L'installation et l'évolution de la maladie sont très largement déterminées par les conditions climatiques, notamment l'humidité et la température (Harrison, 1992). Une température comprise entre 15 et 25°C et une humidité relative supérieure à 90% sont particulièrement favorables au développement de la maladie (Krause *et al.*, 1975).





**Figure 1-8 :** Symptômes sur les différents organes de la plante (Photographies INRA – R. Corbière).

A, B et E : Sur les feuilles, les premiers symptômes sont des taches décolorées, d'aspect huileux qui brunissent rapidement et s'entourent d'un liseré clair à la face supérieure du limbe.

D et F : Au niveau des bouquets terminaux, les attaques se manifestent par un brunissement et un recroquevillement des feuilles apicales.

C : Sur tige, les symptômes se manifestent par l'apparition de nécroses brun-violacées.

G : Sur tubercules, des taches superficielles et irrégulières sont observées. Elles sont gris-bleuâtres, violacées ou brunes à l'extérieur et plutôt d'une couleur rouille à l'intérieur.

H : Au champ, les plantes atteintes sont noirâtres, comme si elles étaient brûlées.

La lutte prophylactique face au mildiou de la pomme de terre consiste à limiter au maximum les sources d'inoculum primaire par rotations culturales et élimination des tas de déchets, issus de la récolte précédente, souvent laissés à proximité des parcelles. Les tas de déchets constituent, selon Boyd (1974), la source principale d'inoculum primaire. La prévention des épidémies passe également par l'utilisation de tubercules de semences sains. Enfin, la destruction des fanes avant la récolte par des traitements thermiques, mécaniques ou chimiques permet de diminuer les risques de contamination des tubercules au moment de la récolte (Jensen, 1887).

La lutte chimique, avec l'utilisation de fongicides de contact, pénétrants ou systémiques, reste la principale mesure de lutte contre le mildiou de la pomme de terre (Gaucher *et al.*, 1998). Toutefois, l'utilisation massive de fongicides systémiques a conduit à sélectionner des isolats résistants à ces matières actives, qui appartiennent principalement au groupe des phénylamides (métalaxyl et son énantiomère méfénoxam, bénomyl, oxadixyl) (Gisi & Cohen, 1996). De plus, les effets nocifs de l'emploi des pesticides sur la santé des utilisateurs et sur l'environnement amènent aujourd'hui à les utiliser d'une façon plus raisonnée. Ainsi, des systèmes de prévisions des risques ont été développés afin de rationaliser l'utilisation des traitements chimiques préventifs. Ils sont basés sur le développement de modèles, tels Guntz-Divoux, utilisé en France depuis 1963, ou Blitecast, utilisé aux Etats-Unis, fondés sur la prévision de périodes climatiques favorables aux contaminations. Plus récemment, les résultats obtenus à l'aide du modèle Milsol, fondé sur la modélisation du cycle épidémique complet, sont très encourageants. Pour les variétés sensibles, la stratégie consistant à traiter selon les préconisations des Avertissements Agricoles, basées sur les prévisions des risques simulées, reste la plus efficace (Duvauchelle *et al.*, 2000).

La meilleure alternative à l'utilisation des fongicides est la lutte génétique. De nombreux programmes reposant sur l'introduction de gènes de résistance ont été engagés, avec pour but la sélection de variétés ayant une bonne valeur agronomique et une bonne résistance au mildiou. Ces programmes se sont longtemps basés sur l'introduction de résistances spécifiques, à caractère monogénique. Actuellement, onze de ces gènes (R1-R11) ont été identifiés et introduits chez *S. tuberosum* à partir de *S. demissum* (Black *et al.*, 1953 ; Malcolmson & Black, 1966 ; Wastie, 1991). Des gènes similaires ont également été identifiés chez d'autres espèces apparentées à *S. tuberosum*, telles *S. bulbocastanum* (Helgeson *et al.*, 1998 ; Song *et al.*, 2003), *S. berthaultii* (Ewing *et al.*, 2000 ; Rauscher *et al.*, 2006) ou *S. phureja* (Sliwka *et al.*, 2006). Cependant, ces gènes, conférant à la plante une résistance



totale, sont très rapidement contournés par les populations parasites et ne peuvent constituer à eux seuls une méthode de lutte durable. Les sélectionneurs s'orientent donc actuellement vers la recherche de résistances polygéniques. La gestion de ces résistances, pour éviter leur érosion, consiste à raisonner la lutte en associant différentes résistances (spécifiques et non spécifiques) ou une résistance partielle et une utilisation judicieuse des fongicides. A l'échelle d'une parcelle ou d'une région de production, les associations variétales semblent pouvoir être des moyens complémentaires de lutte (Andrivon *et al.*, 2003a ; Mundt *et al.*, 2002).

### C.3. Agent pathogène

Le mildiou de la pomme de terre est provoqué par *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, agent pathogène particulièrement destructeur de cette culture, mais également capable de causer des dommages sur d'autres Solanacées sauvages et cultivées, en particulier la tomate (Turkensteen, 1978).

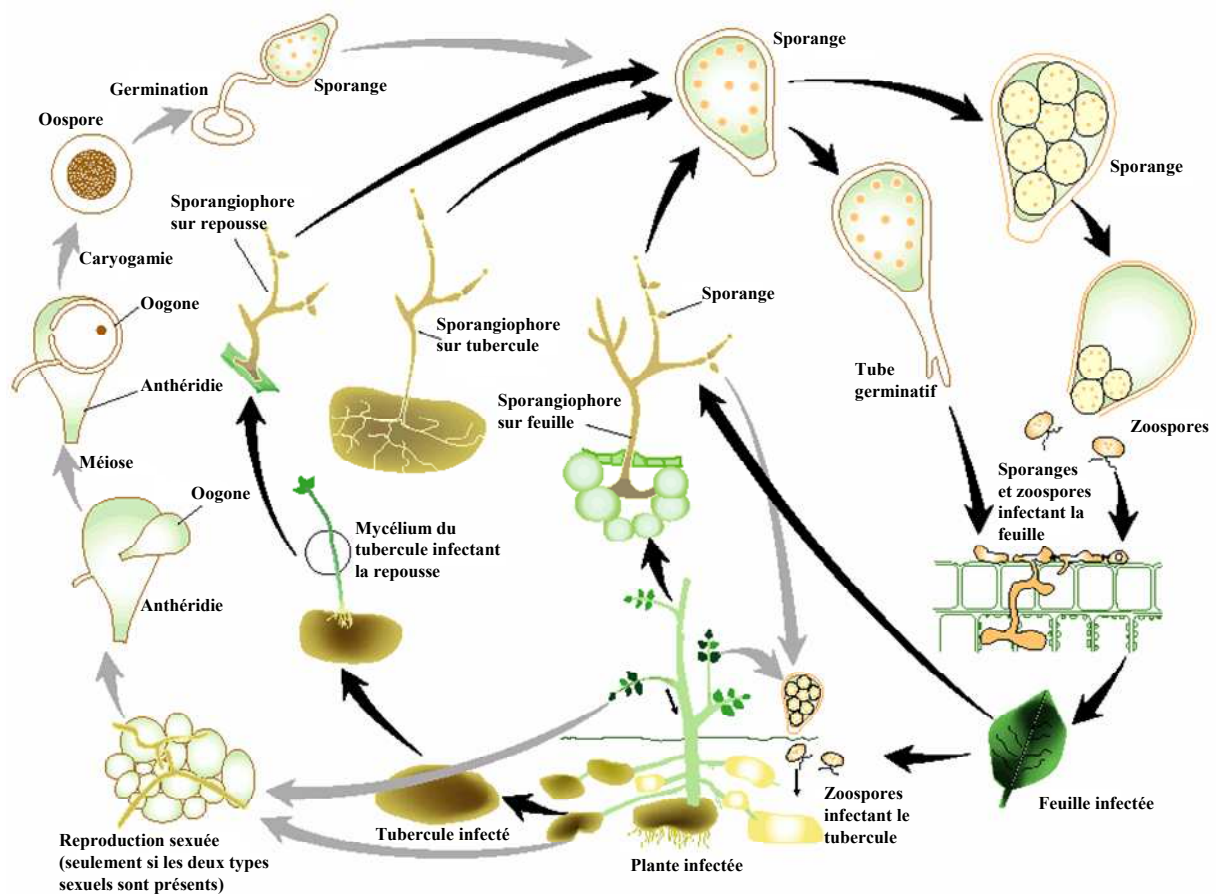
*P. infestans* est un Oomycète de la famille des Pythiacées (Agrios, 1997). Taxonomiquement, les Oomycètes sont des Straminopyles, et sont donc phylogénétiquement plus proches des algues brunes que des champignons supérieurs (Kroon *et al.*, 2004 ; Avila-Adame *et al.*, 2006). Le terme de mycose (ou de maladie fongique) est donc impropre, quoique largement employé, lorsqu'on l'applique au mildiou de la pomme de terre.

Les principales phases du cycle de développement du parasite et de la maladie sur pomme de terre sont présentées sur la figure 1-9. *P. infestans* se caractérise par un cycle majoritairement aérien. Smoot *et al.* (1958) ont établi l'existence de deux types de compatibilité sexuelle, A1 et A2, chez *P. infestans*. La production d'oospores<sup>16</sup>(Fig. 1-10), résultant de la reproduction sexuée intervient uniquement lorsque des souches appartenant à des types sexuels opposés sont en présence. La détermination génétique du type sexuel est simple : ce caractère est codé par un seul gène (Judelson *et al.*, 1995). Les oospores sont capables de se maintenir au moins un hiver au champ et de réinfecter ensuite une culture de pomme de terre (Drenth *et al.*, 1995). En revanche la survie dans le sol du parasite sous forme de mycélium est limitée (Andrivon, 1995). La survie en dehors de la phase de culture de l'hôte se produit essentiellement sous forme de mycélium présent dans les tubercules infectés

---

<sup>16</sup> **Oospore** : Zygote à paroi épaisse caractéristique des Oomycètes.

restant dans les sols, sur repousses et dans les tas de déchets à proximité des champs cultivés (Boyd, 1974). Au printemps suivant, les différentes formes de conservation (mycélium ou oospores) donnent des sporanges, qui peuvent être disséminés sur de longues distances par le vent et la pluie, assurant ainsi l'extension de l'épidémie. Selon la température, les sporanges germent directement (émission immédiate d'un nouveau mycélium), ou libèrent des zoospores biflagellées qui germeront au contact de l'hôte pour pénétrer dans les tissus de la face supérieure des feuilles où se développe un réseau mycélien intra et intercellulaire. Des sporangiophores, formés au travers des stomates de la face inférieure des feuilles, libèrent l'inoculum secondaire (sporangies et zoospores). Dans les conditions optimales de développement de l'agent pathogène, la durée totale du cycle infectieux est de 3 à 5 jours (Bedin, 1986). La brièveté du cycle et la quantité importante d'inoculum secondaire produit expliquent le développement très rapide de la maladie. En fin de culture, les sporanges tombent sur le sol et sont entraînés par ruissellement d'eau vers les tubercules. Le parasite pénètre dans les tubercules par les lenticelles ou par des blessures, forme un mycélium et redémarre un cycle.



**Figure 1-9 :** Cycle de développement de *Phytophthora infestans*. D'après : <http://www.eucablight.org>.



**Figure 1-10 :** Oospore de *Phytophthora infestans* colorée au bleu Coton et observée au microscope au grossissement 1000 (Photographie INRA – R. Corbière).

Des progrès ont été réalisés dans la définition de la diversité des populations de *Phytophthora infestans* dès lors que des marqueurs moléculaires ont été disponibles, c'est-à-dire entre la fin des années 1980 et le début des années 1990 (Forbes *et al.*, 1998). Les allozymes et les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ont révélé une faible diversité en génotypes partout dans le monde, excepté au Mexique, avant 1980. Depuis, de nouveaux génotypes, provenant de différentes migrations depuis le Mexique (Goodwin, 1997) et notamment, en ce qui concerne l'Europe, *via* les importations de pomme de terre pour compenser le déficit de production lié à la sécheresse de 1976, ont remplacé l'ancienne population clonale (Spielman *et al.*, 1991). Ces génotypes avaient un avantage sélectif : résistance au métalaxyl, forte agressivité, reproduction asexuée rapide et possibilité de reproduction sexuée (Kato *et al.*, 1997 ; Day & Shattock, 1997). Ainsi, jusqu'au début des années 1980, les populations européennes de *P. infestans* ne renfermaient que des souches appartenant au type sexuel A1, le type sexuel A2 n'étant présent qu'au Mexique (Niederhauser, 1991). Le type sexuel A2 a d'abord été mis en évidence en Suisse en 1981 (Hohl & Iselin, 1984). Il a ensuite été identifié dans de nombreux pays du nord de l'Europe tels que les Pays-Bas (Frinking *et al.*, 1987), l'Allemagne (Rullich & Schöber, 1988), la Grande-Bretagne (O'Sullivan & Dowley, 1991), la Pologne (Therrien *et al.*, 1993) ou la Norvège (Hermansen *et al.*, 2000). Mais en France, l'absence du type sexuel A2 empêche la reproduction sexuée et donc la formation d'oospores. Ainsi, la survie de *P. infestans* pendant l'hiver se produit sous forme de mycélium présent dans les tubercules infectés restant dans les sols, sur repousses et dans les tas de déchets à proximité des champs cultivés. Quelques rares souches A2 ont été détectées en 1997 et 1998, essentiellement sur tomate et dans des jardins privés (Lebreton *et al.*, 1998), mais sans preuve directe d'une reproduction sexuée effective au champ. La surveillance s'est poursuivie mais l'ensemble des souches testées en 1999, 2000 et 2001 se sont révélées appartenir au type sexuel A1 (Détourné *et al.*, 2004).

#### C.4. Avantages du couple *P. infestans* / pomme de terre en biologie évolutive

Les champignons phytopathogènes offrent une opportunité pour étudier la coévolution hôtes-parasites : l'échantillonnage de ces parasites est grandement facilité par le caractère immobile de l'hôte végétal, et les symptômes sont souvent aisément observables.

*Phytophthora infestans* se comporte dans la nature comme un biotrophe<sup>17</sup> obligatoire (Isaac, 1992 ; Hammond-Kosack & Parker, 2003), sans capacité de survie saprophyte<sup>18</sup> (Andrivon, 1995), mais il peut tout de même être isolé et cultivé en milieu de culture artificiel (Fig. 1-11).



**Figure 1-11 :** Isolat de *Phytophthora infestans* en culture sur milieu gélosé à base de petit pois (Photographie INRA – R. Corbière).

Toujours d'un point de vue pratique, des tests miniaturisés sur folioles détachées (Fig. 1-12) sont disponibles pour tester l'agressivité -estimée par des paramètres tels que la période de latence, la taille des lésions et la quantité de spores produites (Andrivon *et al.*, 2003b; Flier *et al.*, 2003a)- et déterminer les profils de virulence des isolats sur gamme différentielle (Andrivon, 1994). De plus, des variétés de pomme de terre avec des résistances totales ou partielles sont disponibles (Wastie, 1991) et imposent à différentes échelles temporelles et spatiales une sélection forte des populations de *P. infestans*. Enfin, en ce qui concerne la caractérisation moléculaire des populations de *P. infestans*, des marqueurs puissants comme les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism [Flier *et al.*, 2003b]) et/ou les microsatellites, développés très récemment (Lees *et al.*, 2006), sont disponibles.

<sup>17</sup> **Biotrophie** : Modalité de nutrition qui exige une cellule vivante et métaboliquement active comme source d'éléments nutritifs.

<sup>18</sup> **Saprophyte** : Organisme qui se nourrit de matière organique morte.



**Figure 1-12 :** Test de virulence (à gauche) et test d'agressivité (à droite) sur folioles détachées de pomme de terre (Photographies INRA – J. Montarry).

Outre les avantages méthodologiques que présente ce couple hôte-parasite et outre le fait d'être l'agent pathogène le plus dommageable des cultures de pomme de terre, ce qui lui donne une importance économiquement évidente, *P. infestans* est un bon modèle pour étudier l'évolution des populations pathogènes de part ses caractéristiques biologiques. Effectivement, les populations de *P. infestans* sont connues pour évoluer rapidement. La brièveté du cycle, la grande taille des populations, le taux de multiplication important (Harrison, 1992) et les caractères polycyclique (permettant un nombre important de générations au cours d'une saison culturale) et polyétique<sup>19</sup> des épidémies de mildiou de la pomme de terre, confèrent aux populations de *P. infestans* une capacité d'évolution rapide. Cette capacité de variation concerne sa virulence mais également son agressivité (Andrivon *et al.*, 2001). Comme nous l'avons vu précédemment, les agents pathogènes transmis avant la mort de leur hôte ont la possibilité d'évoluer vers une agressivité plus forte, et bien que dépendant de son hôte, les spores de *P. infestans* sont transmises avant la mort de la pomme de terre.

<sup>19</sup> **Polyétique** : Qualifie une épidémie récurrente d'une année à l'autre.

## D. Objectifs de la thèse

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre général de la gestion durable des résistances des plantes aux maladies. L'étude de la durabilité des résistances a pour objectif de concevoir et d'analyser des stratégies de gestion des résistances des plantes cultivées. Ces stratégies, pour être efficaces, doivent intégrer des connaissances sur l'évolution des populations pathogènes, puisque la durabilité d'une résistance n'est rien d'autre qu'une mesure de la vitesse d'adaptation des populations pathogènes à la sélection qu'exerce cette résistance. Comprendre la sélection exercée par la plante hôte et ses conséquences sur la structure des populations pathogènes est donc essentiel à la gestion des maladies des plantes par voie génétique, que ce soit *via* la création variétale ou *via* l'identification des meilleures stratégies de déploiement de ces variétés dans le temps et l'espace.

Les résistances partielles sont actuellement recherchées en priorité dans les programmes d'amélioration des plantes pour la résistance aux bioagresseurs, car elles sont supposées plus durables que les résistances totales. Toutefois, il existe très peu de données concernant le niveau de variabilité des populations pathogènes vis-à-vis de ce type de résistance et de ces composantes. La mesure de cette variabilité est importante pour évaluer la nature et l'intensité des pressions sélectives, et donc la capacité d'adaptation de ces populations pathogènes aux résistances partielles déployées en culture.

Enfin, si l'évolution des populations pathogènes est fortement dépendante de la sélection imposée par les plantes hôtes pendant les épidémies, elle dépend également des phénomènes de sélection imposés à ces populations entre les épidémies, et des trade-offs éventuels entre le pouvoir pathogène et la capacité de survie.

Le couple *Phytophthora infestans* / *Solanum tuberosum* présente, comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux avantages pour l'étude de la réponse adaptative des populations pathogènes au déploiement des résistances des plantes.

Le faible taux de renouvellement des variétés en culture de pomme de terre impose, pour qu'une résistance présente un intérêt, que celle-ci soit durable. Or, la durabilité des résistances spécifiques est faible, comme l'ont montré dans le passé les nombreux épisodes de contournement des gènes R (voir par exemple Wastie, 1991). Les résistances partielles pourraient présenter une durabilité plus grande. Toutefois, la large gamme d'agressivité présente dans les populations françaises de *P. infestans* (Lebreton *et al.*, 1999) laisse penser

que ce parasite pourrait s'adapter assez rapidement aux nouvelles variétés. Dès lors, il apparaît clairement que l'analyse et l'évaluation de la durabilité d'une résistance ne pourront se faire que sur la base de mesures de la diversité des populations et de leur adaptation à différentes sources de résistance.

Avoir une forte agressivité pendant la saison culturale n'implique pas pour autant de bonnes capacités de survie entre les saisons. Par exemple, Carson (1998) a mis en évidence une corrélation négative entre la capacité de survie dans le sol et l'agressivité de souches de *Cochliobolus heterostrophus*, agent pathogène du maïs. Pendant la survie hivernale, *P. infestans* est fortement dépendant de son hôte, ce qui limite potentiellement son agressivité pendant la phase de survie. Comprendre l'effet de la phase de survie hivernale sur la structure des populations de *P. infestans* est donc essentiel pour considérer le caractère polyétique de cette maladie et ne pas limiter les modèles d'évolution des populations à une seule saison épidémique.

**Les objectifs spécifiques de ce travail de thèse sont donc :**

- i) de comprendre comment une population locale de *P. infestans* se structure en fonction de variétés de pomme de terre présentant différents niveaux de résistance, par rapport à la virulence, à l'agressivité et à la structure génétique de ces populations ;
- ii) de déterminer si les pressions de sélection exercées depuis de nombreuses années par les variétés qui dominent les principaux bassins de production français entraînent l'adaptation locale des populations de *P. infestans* ;
- iii) de déterminer si la survie des souches de *P. infestans* pendant la période hivernale est dépendante de leur agressivité ou si elle se fait de façon aléatoire.

## ***Chapitre 2***

***Structuration d'une population pathogène locale  
par des génotypes hôtes présentant différents  
niveaux de résistance***



## **STRUCTURATION D’UNE POPULATION PATHOGENE LOCALE PAR DES GENOTYPES HOTES PRESENTANT DIFFERENTS NIVEAUX DE RESISTANCE**

Nous appréhenderons dans ce chapitre l’impact de la sélection imposée par des génotypes hôtes présentant différents niveaux de résistance sur la structure locale, phénotypique et génotypique, d’une population pathogène.

L’échantillonnage d’isolats de *Phytophthora infestans*, réalisé deux années consécutives (2001 et 2002) sur les variétés de pomme de terre Bintje (variété sensible), Désirée (variété partiellement résistante) et Naturella (variété à résistance spécifique conférée par le gène R2), puis leur caractérisation biologique pour le pouvoir pathogène (virulence déterminée sur gamme différentielle, et agressivité sur chacune des variétés) et moléculaire (AFLP), ont été utilisées pour répondre à trois questions de recherche principales :

- les populations de *P. infestans* échantillonnées sur des cultivars présentant différents niveaux de résistance diffèrent-elles pour leur pathogénicité (virulence et agressivité) ?
- ces populations diffèrent-elles pour leurs marqueurs moléculaires (AFLP) supposés neutre sélectivement ?
- existe-t-il une relation directe entre les structures génotypique et phénotypique de ces populations ?

**Les résultats rapportés dans ce chapitre font l’objet d’une publication dans *Journal of Evolutionary Biology*.**

## Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems?

J. MONTARRY, R. CORBIERE, S. LESUEUR, I. GLAIS & D. ANDRIVON\*

INRA, UMR BiO3P, Le Rheu Cedex, France

\*Correspondence: D. Andrivon, INRA, UMR BiO3P, BP 35327, F-35653 Le Rheu Cedex, France.

Tel.: (+ 33) 223 485193; fax: (+ 33) 223 485180; e-mail: Didier.Andrivon@rennes.inra.fr

Understanding the consequences of selection by host resistance on pathogen population structure provides useful insights into the dynamics of host-parasite co-evolution processes and is crucial for effective disease management through resistant cultivars. We tested general vs. local population adaptation to host cultivars, by characterising a French collection of *Phytophthora infestans* (the causal organism of potato late blight) sampled during two consecutive years on cultivars exhibiting various levels of resistance. Local populations were structured by the host for virulence (qualitative pathogenicity) but also for aggressiveness (quantitative pathogenicity). All populations had a low genotypic diversity for AFLPs, and were presumably made of a few closely related clonal lineages. No correlation was detected between pathogenicity traits and AFLP genotypes. The data support the hypothesis of general adaptation for aggressiveness, to which directional selection for virulence is superimposed when race-specific resistance is introduced.

**Keywords:** Adaptation, aggressiveness, directional selection, *Phytophthora infestans*, resistance gene management, virulence.

Received 18 May 2005; revised 21 June 2005; accepted 11 July 2005

J. EVOL. BIOL. **19** (2006) 522-531 © 2005 EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY

## A. Introduction

Plant diseases impose a major constraint on food production worldwide. They are often combated with pesticides, but the limited efficacy of control measures (Oerke & Dehne, 1997), as well as the need to develop more sustainable production systems for both intensive and resource-poor farmers fuels a trend towards a limitation of pesticide applications. Among possible alternatives to chemical control, both qualitative and quantitative plant resistance bear a lot of promise, but can only be used in the long term and accepted in the short term if their durability is ascertained. Durability of host resistance was defined as the persistence of resistance efficiency when resistant cultivars are used over long periods, on large surfaces and in the presence of the target pathogen (Johnson, 1981, 1984): it therefore depends primarily on the rhythm of adaptive changes affecting pathogen populations in response to selection by host resistance. The question of pathogen response to host resistance genes has received considerable attention from an evolutionary standpoint (see Zhan et al., 2002 for a review). Indeed, selection by hosts probably plays the most prominent role among evolutionary forces shaping pathogen population structures (Mc Donald & Linde, 2002), and it is also the force that can be best manipulated by man, through plant breeding and cultivar deployment (Palumbi, 2001).

Two main types of adaptive patterns can be expected to occur in pathogen populations when parasites are not able to choose their host actively: either general adaptation to the most common host cultivar, or specific local adaptation (or maladaptation) to each different host cultivar leading to a highly fragmented pathogen population (Gandon et al., 1996, 1998). Theoretical models have shown that the actual patterns depend primarily on the balance between selection, gene flow, and population size (Gandon & Michalakis, 2002). They also depend on the type of resistance involved, and on the specificity of the host pathogen interaction (Gandon & Michalakis, 2000). Observations of population structures are abundant for qualitative, gene-for-gene systems (Flor, 1971). In such systems, where resistance and specific pathogenicity (here termed virulence, according to Vanderplank, 1963) are inherited as single genes with matching products (Pedley & Martin, 2003), many examples of selection processes leading to invasion of pathogen populations by virulent phenotypes and resistance breakdown have been described (e.g. Vanderplank, 1968; Wolfe, 1993). Empirical evidence for adaptation to quantitative, polygenic resistance is much more limited, and points to either

directional selection towards increased aggressiveness (*i.e.* quantitative pathogenicity; see Andrivon, 1993) or to local maladaptation (Kaltz et al., 1999; Zhan et al., 2002).

Current theoretical models on co-evolution in host-pathogen systems with quantitative resistance and pathogenicity can yield conflicting predictions on resistance durability. While Gandon & Michalakis (2002) predict that hosts with partial resistance will increase selection for aggressive pathogen genotypes and thus will lead to resistance breakdown if deployed as monocultures, Gould et al. (1991) conclude that aggressiveness will evolve slowly in the presence of partially resistant hosts. These apparent discrepancies are consequences of the model assumptions, but might also reflect differences between pathosystems for key parameters (for instance multiplication rates, typically much higher in plant pathogenic fungi or bacteria than in animal parasites). Furthermore, there is so far a very limited corpus of data (e.g. Burdon, 1993b; Leung et al., 1993) on population structure for both selected and neutral traits (needed to separate selective effects from other evolutionary mechanisms) in heterogeneous habitats. Finally, the biological characteristics of many pathosystems do not consistently favour *a priori* the emergence of one type of adaptive pattern. For instance, the causal agents of rusts, powdery or downy mildews are characterised by an (almost) strictly biotrophic cycle, and by very large multiplication rates and dissemination distances. In such plant-pathogen systems, biotrophy should favour local adaptation that large dissemination distances of pathogen propagules – and hence substantial gene flow - will tend to negate. It is therefore essential to collect experimental data to ascertain adaptive patterns in co-evolving host-pathogen systems.

From an experimental point of view, plant pathosystems involving major diseases of important agricultural crops constitute good experimental models for investigating selection processes, because they allow manipulating selection pressures (*i.e.* the type and levels of host resistance) and their intensity through the spatial arrangement and the size of plots. In this respect, potato late blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, is an adequate system to work with. Late blight is one of the most destructive diseases of the cultivated potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* L.). Although it can be isolated and maintained on artificial culture media, the pathogen behaves in nature as an obligate biotroph with no saprotrophic survival ability (Andrivon, 1995). It is characterised by a primarily aerial life cycle (Alexopoulos et al., 1994). Its large multiplication rate (Harrison, 1992) and polycyclic epidemics should favour rapid response to selection by its hosts, which may however be counterbalanced by the large dispersion capacity of the asexual sporangia

containing the infective zoospores (Bourke, 1964). Cultivars with both race-specific and quantitative, partial resistance to late blight already exist (Wastie, 1991), and miniaturized tests to assay populations for both virulence (Andrivon, 1994) and aggressiveness (Andrivon et al., 2003b; Flier et al., 2003a) are available. Furthermore, genetic markers for fingerprinting *P. infestans* populations have also been developed, and AFLP markers with high levels of polymorphism in European populations of the pathogen have been described recently (Flier et al., 2003b).

This study addressed three main questions: i) do *P. infestans* populations sampled from cultivars with different resistance phenotypes differ for the pathogenicity traits (virulence and aggressiveness); ii) do these populations differ for molecular markers (AFLP fingerprints) supposed to be selectively neutral; and iii) is there a direct relationship between phenotypic and genotypic population structures? To this end, we investigated the genotypic and phenotypic structure of populations sampled from three potato genotypes with different levels of resistance (one susceptible cultivar, one cultivar with quantitative resistance and one cultivar with a qualitative, race-specific resistance) in one French location during two consecutive years. Each isolate was characterised genotypically by the AFLP fingerprints generated with two different primer pairs, and phenotypically by its virulence profile on a standard set of differential host cultivars bearing specific resistance genes and its aggressiveness (*i.e.* the severity of symptoms it induced on compatible cultivars), determined in cross-inoculation experiments on sympatric and allopatric cultivars. In this context, the ‘sympatric cultivar’ for any given isolate is defined as the cultivar from which it was collected; the ‘allopatric cultivars’ are the cultivars included in the test and different from the cultivar of origin of the isolate.

## **B. Materials and methods**

### *B.1. Phytophthora infestans isolates*

One hundred and thirty-nine single-lesion isolates were sampled during two consecutive years (2001, 66 isolates; 2002, 73 isolates) from similar experimental field plots planted with cultivars Bintje (susceptible to late blight), Désirée (possessing a moderate level of quantitative resistance to late blight) and Naturella (possessing the R2 resistance gene

conferring complete resistance only to isolates bearing the matching avirulence allele) at the INRA experimental facilities in Ploudaniel, western France (48°30'N, 4°19'W). In both years, the trials contained two plots (8 rows of 10 plants each) of each cultivar distributed in a block design. Samples of infected leaf tissue were collected each year during the first phase of the epidemic (24 July 2001 and 2 July 2002) in each of the two replicate plots, and the position of the samples in the plot recorded. Each single-lesion isolate was obtained by placing 1 cm<sup>2</sup> pieces of infected tissue on tuber slices of potato cultivar Bintje, kept in Petri dishes for seven days at 15°C. Pure cultures were then obtained by transferring small pieces of mycelium growing on the upper side of potato slice to pea agar supplemented with 200 mg.l<sup>-1</sup> ampicillin, 30 mg.l<sup>-1</sup> rifamycin, 10 mg.l<sup>-1</sup> benomyl and 0.4 ml.l<sup>-1</sup> pimarinic. After about 10 days, growing colonies were transferred to pea agar without antibiotics, and subsequently maintained at 15°C.

### B.2. Mating type determination

Since *P. infestans* is an heterothallic organism, isolates from opposite mating types (A1 and A2) need to be present simultaneously on the same plant/organ for the pathogen to undergo sexual reproduction. We therefore determined the mating type of each isolate by pairing on pea agar with known A1 and A2 testers, incubating in the dark at 18°C for 10 to 14 days, and observing cultures for oospore formation under a microscope (Shaw et al., 1985), to know whether sexual reproduction could occur in the population sampled. Isolates forming oospores with the A1 tester were rated as A2 mating type and those that formed oospores with the A2 tester were rated as A1 mating type.

### B.3. Pathogenicity tests

#### *a. Potato plant material*

Plants were grown in 13 cm pots (one tuber per pot) filled with 1:1:1 sand-peat-compost mixture, in a glasshouse regulated at 15-20°C (night/day temperatures) and 16 h of photoperiod. Plants were watered with a nutrient solution (Hakaphos; NPK 15/10/15) once a week.

*b. Inoculum preparation*

Sporangial suspensions of each isolate were prepared from 15-days-old cultures on pea agar, and adjusted to  $5.10^4$  sporangia per mL using a haemocytometer. Before inoculation, sporangial suspensions were kept at 4 °C for approximately 4 hours to promote zoospore liberation.

*c. Virulence phenotype determination*

Virulence patterns were determined using the international late blight differential set of potato clones, each having one of the R1-R11 race-specific resistance genes, and 2 susceptible cultivars (Bintje and Craig's Royal). The R9 differential was not available, and hence virulence to R9 could not be assessed; to our knowledge, this gene has never been introduced into commercial cultivars. Since the physiological age of plants can affect the expression of resistance genes (Stewart, 1990), all tests were performed using leaflets detached from 6-8-week-old plants. Each leaflet was placed abaxial face up on a moist filter paper in a clear plastic dish, and inoculated by depositing a 20 µL drop of the sporangial suspension (containing *ca.* 1000 spores) on each side of the midrib. Two leaflets per isolate and differential host were inoculated. Dishes containing the inoculated leaflets were deposited in clear plastic boxes, and incubated in an illuminated incubator for 7 days at 18°C/15°C day/night with 16 h day length. After incubation, each inoculation site was scored for the presence or absence of a sporulating lesion.

*d. Aggressiveness quantification*

Each isolate was tested for aggressiveness on each of the three cultivars included in the field trial (Bintje, Désirée and Naturella). Six leaflets of each cultivar were detached from 6-8-week-old plants, measured for length and width, and placed abaxial face up on the lids of inverted Petri dishes containing 12 g.L<sup>-1</sup> water agar (two leaflets per dish). The area of each leaflet was calculated assuming an elliptic shape; previous tests had shown that areas calculated in this way were highly correlated with actual leaflet areas measured with a photoplanimeter ( $r^2=0.93$ ; data not shown). Each leaflet was infected by depositing a 20 µL drop of the sporangial suspension as close as possible to the leaflet centre. Inoculated leaflets were then incubated as described for the virulence tests. Seven days after inoculation, lesion extension was measured in two perpendicular directions. Lesion size (LS) was calculated from the measurements assuming an elliptic shape. Infection efficiency (IE) was assessed as the proportion of inoculated sites that developed sporulating lesions. Then, leaflets were

washed with 10 mL Isoton II (saline buffer), and the sporangia production (SP) per leaflet was determined with a Coulter Z2 counter (Beckman Coulter France, Villepinte, France). The sporulation capacity (SC) was calculated as the number of sporangia produced per cm<sup>2</sup> of lesion.

#### B.4. Molecular characterization

Isolates of *P. infestans* (43 out of the 66 from 2001 and 71 out of the 73 from 2002) were grown in liquid pea medium autoclaved for 20 min at 120°C. After 10 to 15 days of incubation at 18°C, mycelium was filtered, washed in sterile water, and lyophilized. DNA was extracted as described by Lebreton et al. (1998) and stored in TE buffer containing 1 M Tris-HCl and 0.5 M EDTA (pH 8.0). DNA integrity and concentration (with Smart-Ladder) were checked on 1% agarose gels.

The AFLP fingerprinting was performed using a protocol adapted from Van der Lee et al. (1997) by Lebreton et al. (2004). Preamplification was performed with Eco-0 (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') and Mse-C (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3') primers and two combinations of primers were used for selective amplification of each isolate, 5'FAM-Eco-GA/Mse-CC (5'-GACTGCGTACCAATTCGA-3'/5'-GATGAGTCCTGAGTAACC-3') and 5'FAM-Eco-AC/Mse-CG (5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'/5'-GATGAGTCCTGAGTAACG-3'). *Eco* primers were labelled with a fluorescent marker that was detected by the CDD camera of the ABI PRISM 310 sequencer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) used to detect the amplified fragments. DNA fragments were automatically sized compared with the Genescan-400 HD size standard (Perkin-Elmer France) with the ABI Prism Genescan 3.5 software.

#### B.5. Data analyses

##### *a. AFLP fingerprints*

The size of each AFLP band ranging from 50 to 400 bp was determined using the ABI PRISM Genescan 3.5 software. The presence or absence of each band was recorded for each isolate in a binary matrix. The AFLP data from the two primer sets were combined and a cluster analysis of matrix values was performed with the unweighted pair-group method with



arithmetic averages (UPGMA) based on the Dice's coefficient (Nei & Li, 1979), using the BioNumerics software (Applied Maths BVBA, Kortrijk, Belgium).

*b. Phenotypic and genotypic diversity*

Virulence patterns and AFLP patterns were used to calculate the diversity in each population with the Shannon index (Sheldon, 1969):

$$H_s = -\sum_i (p_i \cdot \ln p_i)$$

where  $p_i$  is the frequency of the  $i^{\text{th}}$  genotype (AFLP) or phenotype (virulence) in the population. Diversities between cultivars of origin were statistically tested for each year using a two-tailed t-test (Hutcheson, 1970).

*c. Aggressiveness data*

Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure in the STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM SOFTWARE (SAS Institute Inc., Cary, NC). The effects on aggressiveness (Y) distribution of two sets of variables: cultivar of origin ( $\alpha_i$ ) and cultivar tested ( $\beta_j$ ) on one hand, pathogen AFLP pattern ( $\delta_m$ ) on the other hand, were tested through ANOVA models. Year effects ( $\gamma_k$ ) were included in both ANOVA models, which could therefore be written as:

$$(1) \quad Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$$

$$(2) \quad Y_{kmn} = \mu + \gamma_k + \delta_m + \gamma\delta_{km} + \varepsilon_{kmn}$$

When significant effects were detected, means were compared with the Student Newman and Keuls test ( $P = 0.05$ ).

## C. Results

### C.1. Mating type

All isolates from 2001 and 69 of the 73 isolates from 2002 belonged to the A1 mating type. The four other isolates in the 2002 collection belonged to the A2 mating type and all originated from Naturella; two of them were from one plot, the other two coming from the other plot. In each of these plots, A1 isolates were also present.

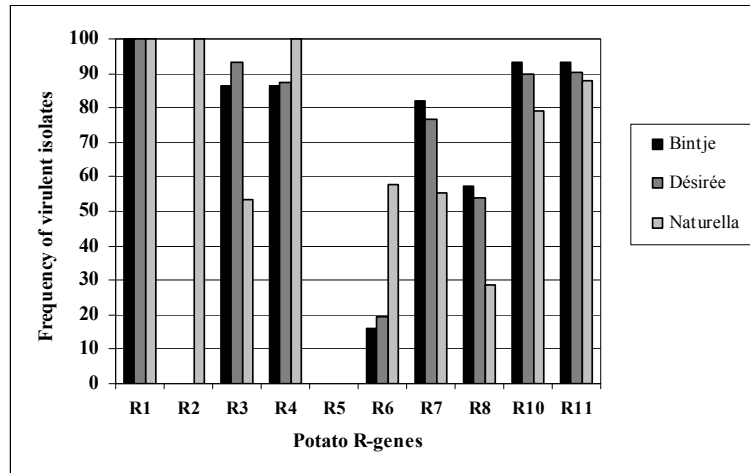
C.2. Virulence

In 2001, 31 different virulence phenotypes were detected among the 66 isolates tested; and 18 among the 73 isolates from 2002. During the two years, the most common virulence phenotype was 1.3.4.7.8.10.11 (*i.e.* isolates able to infect and sporulate on hosts possessing any combination of the race-specific resistance genes R1, R3, R4, R7, R8, R10 and R11). Its frequency was much higher in 2002 (41.1%) than in 2001 (10.6%). Diversity for virulence differed markedly not only between years, but also between cultivars: in 2002, the population from cv. Naturella was significantly more diverse than populations from cv. Désirée ( $t_{48}=2.22$ ,  $P=0.0312$ ) and cv. Bintje ( $t_{47}=3.44$ ,  $P=0.0012$ ), whereas in 2001 there was no significant difference in virulence phenotype diversity according to cultivars (Table 2-1). Virulence phenotypes were usually complex, each isolate possessing 4 to 9 virulence factors (*i.e.* being able to overcome four to nine of the 10 race-specific resistance genes included in the differential host set). All isolates were virulent to R1, and more than 70% of them were virulent to R3, R4, R7, R10 and R11. None of the 139 isolates tested was virulent to R5. Only isolates from cv. Naturella were virulent to R2 (fig. 2-1).

**Table 2-1: Shannon indices for virulence phenotype and AFLP diversity in *Phytophthora infestans* populations sampled in Ploudaniel (western France) from three potato cultivars (Bintje - susceptible; Désirée - partially resistant; Naturella - with the race-specific resistance gene R2) in each of two consecutive years (2001 and 2002).**

|           | 2001    |         |           | 2002    |         |           |
|-----------|---------|---------|-----------|---------|---------|-----------|
|           | Bintje  | Désirée | Naturella | Bintje  | Désirée | Naturella |
| Virulence | 2.328 a | 2.433 a | 2.415 a   | 0.859 a | 1.255 a | 1.941 b   |
| AFLP      | 0.808 a | 0.802 a | 0.463 a   | 1.184 b | 0.562 a | 0.849 ab  |

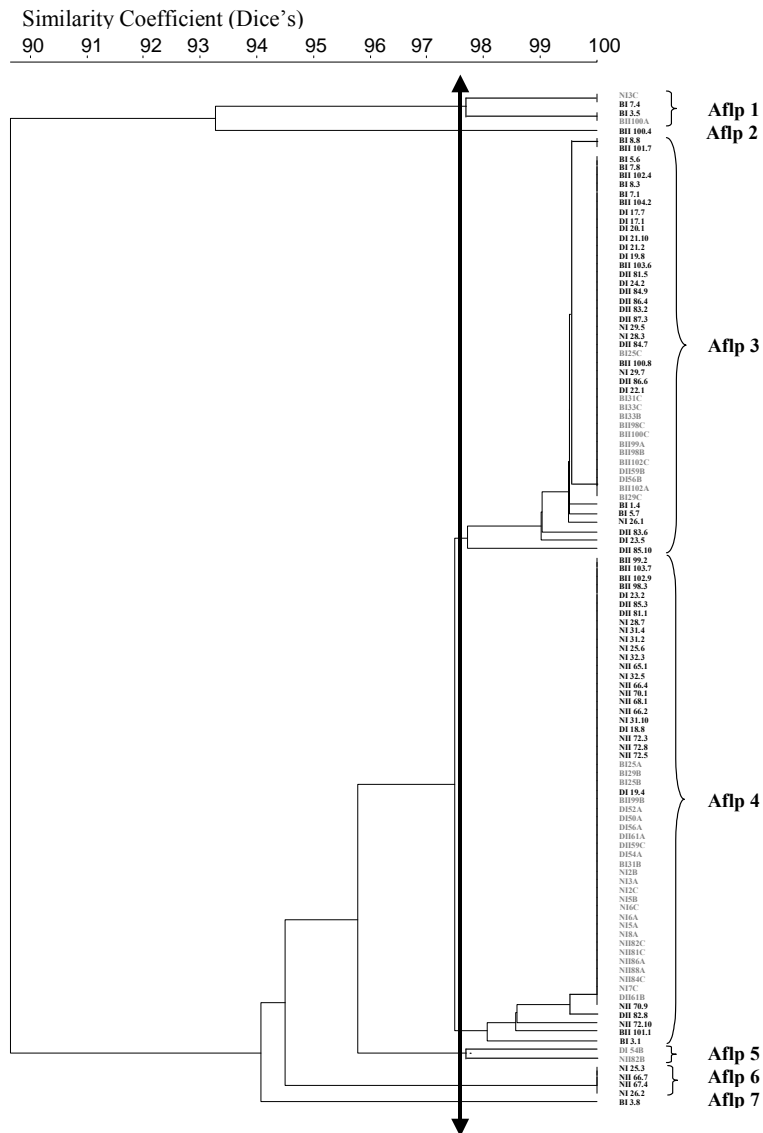
For each year and source of variation (virulence or AFLP genotypes), indices followed by different letters are significantly different (t-test,  $P=0.05$ ).



**Figure 2-1:** Frequency (n=139) of isolates virulent to each R-gene of the international differential set of clones in a collection of *Phytophthora infestans* isolates sampled in Ploudaniel (western France) in 2001 and 2002 from three potato cultivars (Bintje - susceptible; Désirée - partially resistant; Naturella - with the race-specific resistance gene R2).

### C.3. AFLP fingerprints

A total of 156 bands was scored. Thirty of the 81 bands generated with the Eco-GA/Mse-CC combination were polymorphic, as were 31 of the 75 bands generated with the Eco-AC/Mse-CG combination. The congruence index between the two combinations was 85.5%. Genotypic analysis of the 114 isolates revealed 7 AFLP groups (fig. 2-2). The largest genetic distance between isolates, calculated from Dice's coefficient, was 89.65%. The AFLP 6 group contained exclusively the four A2 isolates. Furthermore, variation in genotypic diversity was apparent between samples from year to year and from cultivar to cultivar. In 2002, the population from cv. Bintje was genetically more diverse than that from cv. Désirée ( $t_{34}=2.92$ ,  $P=0.0062$ ), but not from that from cv. Naturella ( $t_{42}=1.43$ ,  $P=0.1601$ ). In 2001, the highest genetic diversity was also observed in the population from cv. Bintje, but did not differ significantly from that in populations from cv. Désirée ( $t_{18}=0.02$ ,  $P=0.9843$ ) or cv. Naturella ( $t_{29}=1.24$ ,  $P=0.2249$ ) (Table 2-1).



**Figure 2-2:** Clustering of AFLP genotypes of *Phytophthora infestans* isolates in populations sampled in Ploudaniel (western France) from three potato cultivars (Bintje - susceptible; Désirée - partially resistant; Naturella - with the race-specific resistance gene R2) in 2001 (grey) and 2002 (black). Genetic distances between clusters were estimated using an UPGMA algorithm applied to the matrix of Dice similarity index.

#### C.4. Aggressiveness

As only isolates virulent to R2 (*i.e.* those collected from cv. Naturella) could infect Naturella, comparisons between the three origins was possible only for tests performed on cultivars Bintje and Désirée, to which all isolates were pathogenic. No statistical correlation was found between the different aggressiveness components.

*a. Infection efficiency*

Neither the cultivar of origin nor the test cultivar significantly influenced IE ( $F_{2,256}=0.13$ ,  $P=0.8817$  and  $F_{1,256}=0.51$ ,  $P=0.4779$ , respectively). However, IE was significantly higher for isolates sampled in 2001 than for those sampled in 2002 ( $F_{1,256}=125.67$ ,  $P<0.0001$ ). IE was the only aggressiveness component which differed between years.

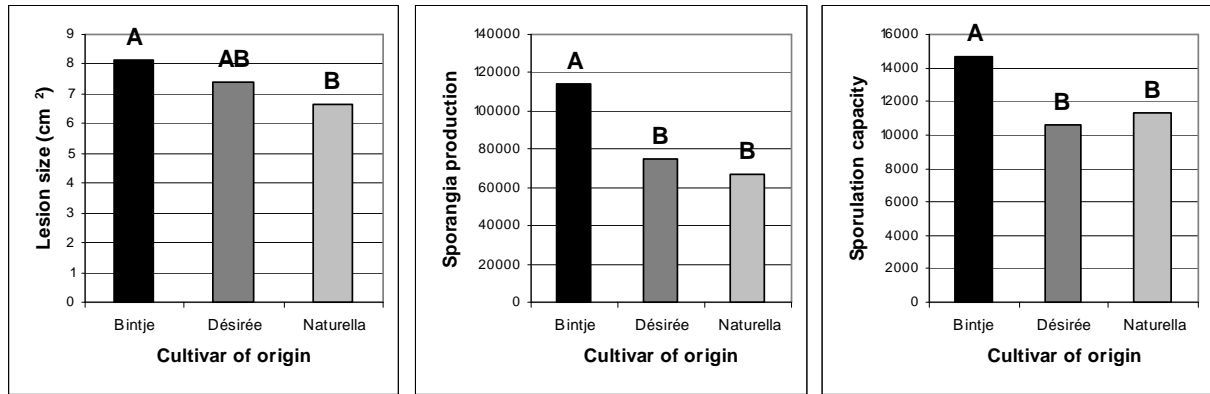
*b. Lesion size*

The only significant effect on LS was from the cultivar of origin ( $F_{2,256}=5.32$ ,  $P=0.0055$ ). Comparison of means (Fig. 2-3) indicated that isolates from Bintje caused the largest lesions whereas isolates from Naturella caused the smallest lesions.

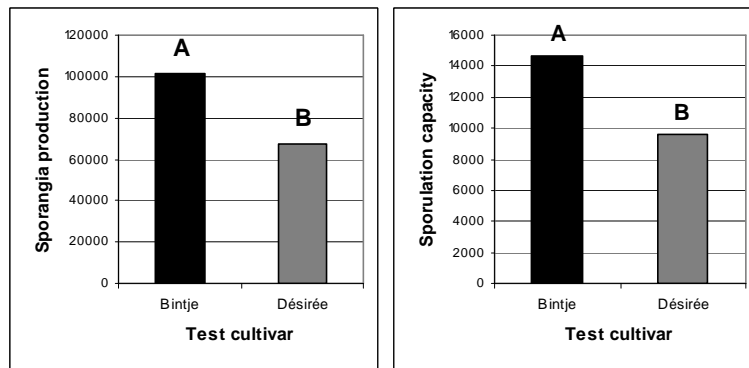
*c. Sporangia production and sporulation capacity*

ANOVA showed significant effects of cultivars of origin and of test cultivars on SP ( $F_{2,256}=16.27$ ,  $P<0.0001$  and  $F_{1,256}=20.70$ ,  $P<0.0001$ , respectively) and on SC ( $F_{2,256}=9.48$ ,  $P=0.0001$  and  $F_{1,256}=36.55$ ,  $P<0.0001$ , respectively). Comparisons of means indicated that isolates from Bintje sporulated most (highest SP and SC) (Fig. 2-3). SP and SC were higher on the test cultivar Bintje than on Désirée (Fig. 2-4), confirming previous observations showing that the partial resistance of Désirée is due to a reduction of the *P. infestans* sporulating potential (Pilet, 2003).

Statistical analysis indicated that isolates from the susceptible cultivar sporulated most and caused the largest lesions; so, the most aggressive isolates came from the susceptible cultivar Bintje. The absence of interaction between test cultivar and cultivar of origin for all aggressiveness variables ( $F_{2,256}=0.56$ ,  $P=0.5719$  for IE;  $F_{2,256}=0.61$ ,  $P=0.5449$  for LS;  $F_{2,256}=1.39$ ,  $P=0.2506$  for SP and  $F_{2,256}=0.24$ ,  $P=0.7882$  for SC) indicated that the relative ranking of the three origins was similar on Bintje and on Désirée.



**Figure 2-3:** Lesion size, sporangia production and sporulation capacity, according to cultivars of origin, in *Phytophthora infestans* populations sampled from three cultivars and tested on two of them (Bintje and Désirée). A and B represent the homogenous groups identified by the SNK test at the 5 % threshold.



**Figure 2-4:** Sporangia production and sporulation capacity in *Phytophthora infestans* populations sampled from three cultivars according to test cultivars (Bintje and Désirée). Bars in the histograms represent means pooled over all cultivars of origin. A and B represent the homogenous groups identified by the SNK test at the 5 % threshold.

#### *d. Effect of pathogen genotypes*

The statistical analysis was initially conducted only on the two major AFLP groups (AFLP 3 and AFLP 4), because the other groups contained too few isolates. No significant differences between the two AFLP groups were detected for any of the aggressiveness components ( $F_{1,212}=2.27$ ,  $P=0.1330$  for LS;  $F_{1,212}=0.17$ ,  $P=0.6818$  for SP;  $F_{1,212}=2.78$ ,  $P=0.0971$  for SC and  $F_{1,296}=2.60$ ,  $P=0.1077$  for IE). The only significant effect for the statistical model (2) was the year effect for IE ( $F_{1,296}=12.25$ ,  $P=0.0005$ ). AFLP 6 (containing the four A2 isolates found in 2002) proved significantly less aggressive than the two major groups AFLP 3 and AFLP 4 (data not shown).

## D. Discussion

The general objective of this paper was to approach the impact of selection by hosts differing from their resistance level on population structure of *Phytophthora infestans* at a local level. Our data showed that the local populations we studied were clearly structured by host cultivars for both qualitative (virulence) and quantitative (aggressiveness) components of pathogenicity despite their low genotypic diversity when assessed with molecular markers assumed to be selectively neutral.

As expected, the cultivar with a race-specific resistance structured the population for virulence, as only isolates from Naturella were virulent to the gene R2. This could reflect either a fitness cost associated with virulence to R2, or simply an asynchrony in the epidemic development on cultivars with or without R2 (epidemics starting later on R2 cultivars because of the low initial frequency of virulence to R2 in these populations, and therefore developing when cultivars without this gene have already succumbed to blight). The later hypothesis seems more likely in this particular case, as shown by a series of observations and experiments in Ploudaniel in earlier years (Pilet et al., 2005) and by evidence from other European populations of *P. infestans* showing the lack of correlation between fitness and virulence phenotype complexity (Schöber & Turkensteen, 1992; Lebreton et al., 1999). Our data suggest that several mutation events from avirulence to virulence occurred independently in the population studied, since virulent isolates were present in all major AFLP groups. Furthermore, virulence phenotypes were mostly complex, even for isolates from cultivars without R genes (Bintje or Désirée), which tend to indicate that the virulence cost is low for this *Phytophthora infestans* population.

While selection for virulence was expected, selection for aggressiveness was not, since partial resistance is generally assumed to be more durable than gene-for-gene resistance (Johnson, 1984). Indeed, there are very few reports of gradual loss of resistance in time from the many long-term field observations of agroecosystems (Vanderplank, 1968; Mc Donald & Linde, 2002). This implies either that aggressiveness in populations remains stable (Robinson, 1973), because of the lack of variation for this trait in natural populations or because of mechanisms buffering selection for it, or that selection was not maintained for long enough periods to trigger sufficient adaptation in the pathosystems surveyed. Our results show that extensive variation for aggressiveness exists in local *P. infestans* populations, without differential adaptation to partially resistant cultivars. These data, consistent with results

obtained from other populations in France and in Ecuador (Pilet, 2003), suggest that gradual adaptation to partial resistance, eventually leading to the erosion of resistance performance (Mc Donald & Linde, 2002), is possible, and even likely. It would be useful now to also investigate the aggressiveness of our isolates or populations to tubers, given the discrepancy between our results obtained on leaves and previous reports from experiments on tubers (Jeffrey et al., 1962; Caten, 1974; Bjor & Mulelid, 1991) and the lack of correlation between aggressiveness levels to both types of organs (Flier et al., 1998).

Interestingly, in the two years of our study, the most aggressive isolates were found on cv. Bintje (the most susceptible cultivar) and not on cv. Désirée. A possible explanation for this lies in the fact that population size on a susceptible cultivar is larger than on a partially resistant one, and that the multiplication ratio (*i.e.* the ratio of numbers of sporangia produced on Bintje and on Désirée by any given isolate) always exceeds 1. Therefore, differences in aggressiveness among isolates are magnified on susceptible more than on partially resistant cultivars, which in turn favour faster selection of the most aggressive isolates by susceptible cultivars. Another possibility is that local *P. infestans* populations adapt primarily to the locally most abundant cultivar. In France, Désirée is grown only for seed destined for export, and not as a main crop cultivar; its acreage did not exceed 300 ha nationally in 2001/2002 (<http://www.plantdepommedeterre.org/pages/chifcle.htm>). Conversely, Bintje was the single most abundant cultivar, occupying *ca.* 40% of the total potato area (*i.e.* about 80 000 ha) in 2001/2002. Directional selection for aggressiveness certainly occurs in biotrophic pathogens such as *P. infestans*, which depend directly on their hosts for multiplication and survival; it would result in adaptation to the dominant resource (*i.e.* cultivar) provided that the host structure is not a highly fragmented mosaic of cultivars with many different resistance phenotypes (Lively, 1999). The data shown here are obviously not sufficient to prove or disprove adaptation to locally dominant cultivars rather than to susceptible ones, since they are all relative to samples from a single site, which may not represent the French population as a whole despite the lack of a strong geographical differentiation between regions for virulence structures (Lebreton et al., 1998). We are therefore currently testing this hypothesis by sampling populations from regions with different locally dominant cultivars, and looking for local adaptation to these cultivars with cross-inoculation experiments.

The minimum genotypic similarity between isolates constituting our collection was 90%, which clearly suggests that the collection is made of a few closely related clonal lineages, probably deriving from each other by mutation. This is consistent with the view that



*P. infestans* behaves in France as a highly mutable, clonal species (Lebreton et al., 1998). So far, A2 isolates had been detected in France in 1995 and 1996 on tomato and on potato in some private gardens but no evidence for sexual recombination was obtained (Duvauchelle et al., 1997, Lebreton et al., 1998). Although we have detected four A2 isolates, coexisting with A1 isolates in the Naturella plots, during the 2002 sampling, the low genetic diversity and consistent clustering of isolates according to AFLP fingerprints indicate that sexual reproduction played no role in these populations. Furthermore, the low aggressiveness of the four A2 isolates compared to the A1 isolates present in the collection raises doubts as to their ability to persist in populations over several seasons.

The lack of matching between pathogenicity traits and AFLP groups was not surprising. Indeed, Lebreton & Andrivon (1998) did not find a clear correlation between phenotypes (virulence phenotypes and mating types) and genotypes based on neutral markers (RFLP – RG57 fingerprints, mt-DNA haplotypes and allozyme genotypes). Similarly, Mahuku et al. (2000) found no correlation between groups defined by RAPD markers, allozymes, response to metalaxyl and mating type. Virulence is known to evolve through mutation without highly altering molecular fingerprints (Goodwin, 1997). Because most molecular markers used for fingerprinting are selectively neutral, they can be used to assess evolutionary forces other than selection (such as gene flow or genetic drift).

Our data are not sufficient to conclude about host adaptation in the long term, as metapopulation dynamics, most notably local extinction and gene flow can swamp local selective effects (Burdon & Thrall, 1999; Kaltz & Shykoff, 2002). Indeed the most aggressive isolates are not necessarily the fittest isolates over the whole season or over several seasons. Selection occurs during the epidemic season, but possibly also during the winter conservation phase. It is possible that highly pathogenic isolates, which will be favoured during the epidemic season, will be under a negative selection pressure during the winter. Intermediate aggressive isolates would tend to survive best, in contrast to both highly aggressive strains which would probably kill tubers before they sprout, and weakly aggressive strains which would either fail to infect tubers or be inactivated by the phenomenon of lesion arrest (Wastie, 1991). The ability to survive in tubers must have a strong impact on the fitness of the isolates concerned. An experiment is currently underway to measure possible trade-offs between aggressiveness and survival ability in *P. infestans*.

Our findings have important consequences for resistance management. First, the fact that selection exists for both virulence and aggressiveness stresses the necessity to reason the management of both race-specific and partial resistance. Secondly, the variability observed in

the evolution of population structures between cultivars and years might be due in part to the small spatial scale (the field) considered in the present work. We therefore ignored gene and genotype flow from outside our experimental setting. However, genotype flow is one of the important factors influencing the durability of resistance, *i.e.* the speed of population response to selection by resistant hosts (Mc Donald & Linde, 2002). We are currently extending our investigations to selection at the regional scale (several hundred fields), to quantify local and regional influences and produce a predictive, mathematical model of the evolution of population structure under host selection. This model will help identify and assess *in silico* the best possible combinations of resistances and deployment strategies, which cannot be all evaluated experimentally. It will thus prove a valuable tool for orientating breeding schemes for resistance, but also for deploying these cultivars for optimal performance in space and time.

## E. Acknowledgements

We thank D. Ellissèche and R. Pellé (INRA APBV, Ploudaniel) for establishing the experimental field plots and help with *P. infestans* sampling, H. Douchy for participating in the biological tests, and L. Lebreton for very useful advice and help with the AFLP fingerprinting. We are also very grateful to O. Plantard, M. Plantegenest and Y. Michalakis for valuable comments on draft versions of this paper. The work reported here was carried out within the frame of the Blight Mop project supported by the European Union.

## F. References

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M. 1994. *Phytophthora infestans*. In: *Introductory Mycology*, 4<sup>th</sup> edn. (John Wiley and Sons eds.), pp.717-720. New York.
- Andrison, D. 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* **83**: 889-890.
- Andrison, D. 1994. Races of *Phytophthora infestans* in France, 1991-1993. *Potato Res.* **37**: 279-286.

- Andrивon, D. 1995. Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* **85**: 1053-1056
- Andrивon, D., Corbière, R., Lucas, J.M., Pasco, C., Gravouelle, J.-M., Pellé, R., Dantec, J.-P. & Ellissèche, D. 2003. Resistance to late blight and soft rot in six potato progenies and glycoalkaloid contents in the tubers. *Amer. J. Potato Res.* **80**: 125-134.
- Bjor, T. & Mulelid K. 1991. Differential resistance to tuber late blight in potato cultivars without R-genes. *Potato Res.* **34**: 3-8.
- Bourke, P.M.A. 1964. Emergence of potato blight, 1843-46. *Nature* 203: 805-808.
- Burdon, J.J. & Thrall, P.H. 1999. Spatial and temporal patterns in coevolving plant and pathogen associations. *Am. Nat.* **153**: S15-S33.
- Burdon, J.J. 1993. Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance. In: *Durability of Disease Resistance* (Th. Jacobs and J.E. Parlevliet, eds.), pp.41-56. Kluwer Academic Publishers.
- Caten, C. E. 1974. Intra-racial variation in *Phytophthora infestans* and adaption to field resistance for potato blight. *Ann. Appl. Biol.* **77**: 259-270.
- Duvauchelle, S., Lherbier, V., Emery, D., Sarniguet, C., Lebreton, L., Andrивon, D., Gisi, U., Knapova, G. & Edel, D. 1997. Répartition des souches A2 de *Phytophthora infestans* en France en 1996. In: *Cinquième Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes*. pp. 369-374. Tours, France.
- Flier, W.G., Grunwald, N.J., Kroon, L.P.N.M., Sturbaum, A.K., van den Bosch, T.B.M., Garay-Serrano, E., Lozoya-Saldana, H., Fry, W.E. & Turkensteen, L.J. 2003b. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca Valley of central Mexico suggests genetic differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. *Phytopathology* **93**: 382-390.
- Flier, W.G., Turkensteen, L.J. & Mulder, A. 1998. Variation in tuber pathogenicity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Potato Res.* **41**: 345-354.
- Flier, W.G., van den Bosch, G.B.M. & Turkensteen, L.J. 2003a. Stability of partial resistance in potato cultivars exposed to aggressive strains of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* **52**: 326-337.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275-296.
- Gandon, S. & Michalakis, Y. 2000. Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proc. Royal Soc. London B-Biol. Sci.* **267**: 985-990.

- Gandon, S. & Michalakis, Y. 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *J. Evol. Biol.* **15**: 451-462.
- Gandon, S., Capowiez, Y., Dubois, Y., Michalakis, Y. & Olivieri, I. 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proc. Royal Soc. London B-Biol. Sci.* **263**: 1003-1009.
- Gandon, S., Ebert, D., Olivieri, I. & Michalakis, Y. 1998. Differential adaptation in spatially heterogeneous environments and host-parasite coevolution. In: *Genetic Structure and Local Adaptation in Natural Insect Populations* (S. Mopper & S. Strauss, eds), pp. 325-340. Chapman & Hall, London.
- Goodwin, S.B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* **87**: 462-473.
- Gould, F., Kennedy, G.G. & Johnson, M.T. 1991. Effects of natural enemies on the rate of herbivore adaptation to resistant host plants. *Entomol. Exp. Appl.* **58**: 1-14.
- Harrison, J.G. 1992. Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage – a review. *Plant Pathol.* **41**: 384-416.
- Hutcheson, K. 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *J. Theor. Biol.* **29**: 151-154.
- Jeffrey, S.I.B., Jinks, J.C. & Grindle, M. 1962. Intraracial variation in *Phytophthora infestans* and field resistance to potato blight. *Genetica* **32**: 323-338.
- Johnson, R. 1981. Durable resistance: definition of genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* **71**: 567-568.
- Johnson, R. 1984. A critical analysis of durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**: 309-330.
- Kaltz, O., Gandon, S., Michalakis, Y. & Shykoff, J.A. 1999. Local maladaptation in the anther-smut fungus *Microbotryum violaceum* to its host plant *Silene latifolia*: Evidence from a cross-inoculation experiment. *Evolution* **53**: 395-407.
- Kaltz, O. & Shykoff, J.A. 2002. Within- and among-population variation in infectivity, latency and spore production in a host-pathogen system. *J. Evol. Biol.* **15**: 850-860.
- Lebreton, L. & Andrivon, D. 1998. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**: 583-594.
- Lebreton, L., Laurent, C. & Andrivon, D. 1998. Evolution of *Phytophthora infestans* populations in the two most important potato production areas of France during 1992-96. *Plant Pathol.* **47**: 427-439.

- Lebreton, L., Lucas, J.M. & Andrivon, D. 1999. Aggressiveness and competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato and tomato in France. *Phytopathology* **89**: 679-686.
- Lebreton, L., Lucas, P., Dugas, F., Guillerm, A.Y., Schoeny, A. & Sarniguet, A. 2004. Changes in population structure of the soilborne fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* during continuous wheat cropping. *Environ. Microbiol.* **6**: 1174-1185.
- Leung, H., Nelson, R.J. & Leach, J.E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. In: *Advances in Plant Pathology, vol 10* (J.H. Andrews & I.C. Tommenup, eds), pp. 157-205. Academic Press, New York.
- Lively, C.M. 1999. Migration, virulence and the geographic mosaic of adaptation by parasites. *Am. Nat.* **153**: S34-S47.
- Mahuku, G., Peters, R.D., Platt, H.W. & Daayf, F. 2000. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994-96. *Plant Pathol.* **49**: 252-260.
- Mc Donald, B.A. & Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolution potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 349-379.
- Nei, M. & Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5269-5273.
- Oerke, E.C. & Dehne, H.W. 1997. Global crop production and the efficacy of crop protection – current situation and future trends. *Eur. J. Plant Path.* **103**: 203-215.
- Palumbi, S.R. 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* **293**: 1786-1790.
- Pedley, K.F. & Martin, G.B. 2003. Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 215-243.
- Pilet, F. 2003. Epidémiologie et biologie adaptative des populations de *Phytophthora infestans* dans des cultures pures et hétérogènes de variétés de pomme de terre. PhD thesis, ENSA Rennes, France, 157 p.
- Pilet, F., Pellé, R., Ellissèche, D. & Andrivon, D. 2005. Efficacy of the R2 resistance gene as a component for the durable management of potato late blight in France. *Plant Pathol.* **54** (in press).
- Robinson, R.A. 1973. Horizontal resistance. *Rev. Plant Pathol.* **52**: 483-501.
- Schöber, B. & Turkensteen, L.J. 1992. Recent and future developments in potato fungal pathology. *Neth. J. Plant Pathol.* **98** (suppl. 2): 73-83.

- Shaw, D.S., Fyfe, A. M., Hibberd, P.G. & Abdel-Sattar, M.A. 1985. Occurrence of the rare A2 mating type of *Phytophthora infestans* on imported Egyptian potatoes and the production of sexual progeny with A1 mating types from the UK. *Plant Pathol.* **34**: 552-556.
- Sheldon, A.L. 1969. Equability indices: dependence on the species count. *Ecology* **50**: 466-467.
- Stewart, H.E. 1990. Effect of plant age and inoculum concentration on expression of major gene resistance to *Phytophthora infestans* in detached potato leaflets. *Mycol. Res.* **94**: 823-826.
- Van der Lee, T., De Witte, I., Drenth, A., Alfonso, C. & Govers, F. 1997. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.* **21**: 278-291.
- Vanderplank, J.E. 1963. Plant diseases : epidemics and control. Academic Press, New York.
- Vanderplank, J.E. 1968. Disease resistance in plants. Academic Press, New York.
- Wastie, R.L. 1991. Breeding for resistance. In: *Advances in Plant Pathology*, vol. 7, *Phytophthora infestans: The Cause of Late Blight of Potato* (D.S. Ingram and P.H. Williams, eds), pp. 193-224. Academic Press, London.
- Wolfe, M.S. 1993. Can the strategic use of disease resistant hosts protect their inherent durability? In: *Durability of Disease Resistance* (Th. Jacobs & J.E. Parlevliet, eds), pp. 83-96. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Zhan, J., Mundt, C.C., Hoffer, M.E. & McDonald, B.A. 2002. Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *J. Evol. Biol.* **15**: 634-647.



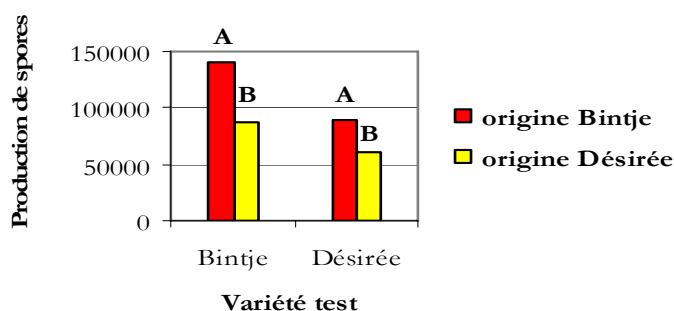
## ***Chapitre 3***

***Adaptation des populations pathogènes aux  
variétés dominantes à l'échelle des bassins de  
production français***



## ADAPTATION DES POPULATIONS PATHOGENES AUX VARIETES DOMINANTES A L'ECHELLE DES BASSINS DE PRODUCTION FRANÇAIS

Dans le chapitre précédent, nous avons vu qu'une population locale de *P. infestans* était structurée par l'hôte pour la virulence : seuls les isolats originaires de Naturella (variété à résistance spécifique conférée par le gène R2) sont capables d'attaquer cette variété. Nous avons aussi montré qu'une telle population est également structurée par l'hôte pour l'agressivité : les isolats originaires de la variété sensible ( Bintje) sont les plus agressifs, tant sur Bintje que sur Désirée (variété partiellement résistante), sans adaptation différentielle entre ces deux génotypes à l'échelle spatiale de micro-parcelles expérimentales (cf. illustration ci-dessous).



**Production de spores selon les variétés tests et d'origine des isolats. A et B représentent les groupes homogènes identifiés (test SNK, P=0,05).**

La variété Désirée n'étant que très peu déployée en culture en France, contrairement à la variété Bintje, l'hypothèse d'une adaptation à la dominance de la variété plutôt qu'à sa sensibilité est formulée.

Les variétés de pomme de terre sont réparties sur le territoire français en fonction des types de production, chaque région employant de manière prédominante et persistante une variété adaptée à son marché propre. Ceci offre donc la possibilité d'étudier l'effet d'une pression sélective maintenue pendant de nombreuses saisons à l'échelle régionale, sur le niveau d'adaptation des populations de *P. infestans* aux variétés dominantes.

L'objectif de ce chapitre sera donc de tester l'hypothèse d'adaptation locale de populations de *Phytophthora infestans* à son hôte cultivé *Solanum tuberosum*, à l'échelle spatiale de bassins de production.

L'échantillonnage, réalisé pendant deux années consécutives (2004 et 2005) dans trois populations naturelles de *P. infestans* (une provenant du bassin de production dominé par la variété sensible Ostara, une seconde provenant du bassin de production dominé par la variété sensible Bintje, et la troisième provenant d'une station expérimentale dépourvue de variété dominante), a été effectué de manière à déterminer si la pression de sélection exercée depuis de nombreuses années par les variétés qui dominent les principaux bassins de production français entraîne l'adaptation des populations de *P. infestans* pour l'agressivité.

Une expérimentation d'inoculation croisée entre les trois populations pathogènes et les deux populations hôtes (Bintje et Ostara) permet de mesurer l'agressivité de chaque population pathogène sur les populations hôtes sympatriques et allopatriques. Une caractérisation génotypique, réalisée avec des marqueurs supposés neutres (microsatellites), apporte des informations supplémentaires sur la structure génétique de ces populations, et sur l'intervention de phénomènes autres que la sélection (flux de gènes et dérive génétique notamment) dans leur évolution. Enfin, des isolats provenant d'essais expérimentaux, comprenant les deux variétés (Bintje et Ostara) et placés dans chacune des trois localités, permettent de dissocier l'effet 'origine géographique' de l'effet 'origine variétale'.

**Les résultats rapportés dans ce chapitre font l'objet d'une publication, soumise à « *Evolution* » en Décembre 2006.**

## **Testing local adaptation in an agricultural plant-pathogen system: a case of general adaptation to the prevalent host.**

J. MONTARRY, I. GLAIS, R. CORBIERE & D. ANDRIVON\*

INRA, UMR BiO3P, Le Rheu Cedex, France

\*Correspondence: D. Andrivon, INRA, UMR BiO3P, BP 35327, F-35653 Le Rheu Cedex, France.

Tel.: (+ 33) 223 485193; fax: (+ 33) 223 485180; e-mail: Didier.Andrivon@rennes.inra.fr

This study addressed the question of local adaptation of *Phytophthora infestans* populations, the causal agent of potato late blight, to two potato cultivars ( Bintje and Ostara), each cultivated for a number of years and over large areas in separate French regions. We measured aggressiveness (quantitative pathogenicity) of each pathogen population to sympatric and allopatric hosts in a reciprocal cross-inoculation experiment. There was no evidence for local adaptation (or maladaptation) in this pathosystem at the spatial scales studied here, as shown by the absence of differential interactions between pathogen and host populations. At both local (field/plot) and regional scales, the distribution of aggressiveness fits a pattern of general adaptation of pathogen populations to the most common host genotype (Bintje), corresponding to a single specialist phenotype of the pathogen optimally adapted to one host cultivar and less well adapted to others. Our observations support the theoretical predictions that large pathogen dispersal rates and important genetic drift, revealed by the comparisons of the genotypic structures of the populations tested, could lead to a local adaptation pattern detectable only at a large spatial scale. The unraveling of adaptive patterns at each of these spatial scales can now be put to use for a more efficient management of the disease by appropriate deployment strategies of potato cultivars.

**Keywords:** Host-pathogen (co)evolution, general adaptation, gene flow, genetic drift, local adaptation, *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*.

## A. Introduction

Three evolutionarily stable states can occur in populations of parasites unable to choose their host actively: absence of adaptation, corresponding to a single generalist phenotype showing a similar degree of adaptation to all habitats; general adaptation to the most common host genotype, corresponding to a single specialist phenotype optimally adapted to one habitat and poorly adapted to other habitats; or specific local adaptation (or maladaptation) to different host genotypes, corresponding to a set of specialist phenotypes each maximizing fitness in one habitat type and leading to a highly fragmented pathogen population (Gandon et al 1996, 1998; Kawecki and Ebert 2004).

Parasites are generally thought to have greater evolutionary potential, and to evolve faster than their hosts: their larger population sizes, shorter generation times and higher rates of mutation and migration put them ahead in the co-evolutionary race, and should make them locally adapted (Hamilton et al. 1990; Ebert and Hamilton 1996; Lively 1996; Kaltz and Shykoff 1998). Local adaptation is the consequence of adaptation to particular host genotypes. It may arise if there are trade-offs in performance on different host populations, or when selection pressures are heterogeneous across host populations (Fry 1996; Kawecki 1998). Several experiments support the idea of local adaptation of parasites, and showed that parasites perform better on sympatric than on allopatric hosts; however, other workers did not find any evidence of parasite local adaptation, and even pointed to local maladaptation of the parasite (see for reviews Kaltz and Shykoff 1998; Kawecki and Ebert 2004).

The process of local adaptation should ideally be tested by comparing adapted parasite populations to their presumably less adapted ancestors. Because this is usually not possible, the pattern of local adaptation is often tested via reciprocal cross-infection experiments, and more generally by reciprocal-transplant experiments (Lively 1996; Kaltz and Shykoff 1998). There are two distinct ways to test for local adaptation in a reciprocal-transplant experiment (Gandon and Van Zandt 1998): i) compare the performance of a parasite population in different environments / hosts (= the 'home vs. away' criterion of Kawacki and Ebert 2004); ii) compare the performance of a parasite population in its native environment with other parasite populations transplanted there from different environments (= the 'local vs. foreign' criterion of Kawacki and Ebert 2004). Both criteria are not independent, but also not equivalent. The first reveals a trade-off in performance across habitats, and thus gives evidence of adaptive costs, whereas the second reveals differences in selection pressures

across habitats. Variation in host resistance can obscure tests using the 'home vs. away' comparison, whereas variation in pathogen aggressiveness (*i.e.*, quantitative pathogenicity – Vanderplank 1963; equivalent to the term 'virulence' as used by evolutionists and ecologists - Jarosz and Davelos 1995; Poulin and Combes 1999) can obscure the 'local vs. foreign' comparison, as showed by Thrall et al. (2002) in the *Linum marginale* – *Melampsora lini* interaction. Moreover, in order to predict the outcome of the coevolutionary conflict between host and parasite or to interpret patterns of local adaptation, it is important to have information on the population structure, usually obtained from neutral molecular markers, of the two partners (Delmotte et al 1999).

In host-pathogen agro-ecosystems, evolutionary forces shaping pathogen population structures is an important research topic; indeed, besides answering key evolutionary questions, testing local adaptation in host-pathogen systems can provide new or improved strategies for the control of diseases. Among evolutionary forces, selection by hosts probably plays the most prominent role (Mc Donald and Linde 2002), and it is also the force that can be most easily manipulated by man. Moreover, hosts are evolutionarily static compared to pathogen populations, as they are made of genetically identical (or homogeneous) plants. Host populations grown as monocultures are highly vulnerable to rapidly evolving parasites (Brown 1994). The Red Queen hypothesis (Van Valen 1973) predicts that parasites should be more locally adapted on asexual hosts than on sexual ones (Ladle 1992). Local adaptation can potentially occur even if hosts are short lived: a large monoculture of short-living hosts might indeed represent the same temporal stability (and thus persistence of selection) as a single long-living host. Heavy parasite loads on short-lived, asexual hosts can therefore be conceptually interpreted in the same way as local adaptation of parasites to long-living, sexually reproducing hosts (Gandon et al. 1998).

Here we investigated local adaptation in the potato late blight agent, the oomycete *Phytophthora infestans*, on its annual host plant, *Solanum tuberosum*. Late blight is one of the most destructive diseases of the cultivated potato. A number of epidemiological and evolutionary features make this association an adequate system to investigate local adaptation process. On the host side, potato cultivars are vegetatively propagated clones; each potato production area is usually dominated for several years or decades by one host cultivar, different between regions. As a consequence, potato crops at a regional scale are akin to persistent monocultures. On the pathogen side, *P. infestans* has a short generation time (3-5 days) and a large multiplication rate (Harrison 1992), resulting in polycyclic epidemics which favor rapid response to selection. Computer simulations suggest that local adaptation depends

on the relative migration rates of host and pathogen: parasites which migrate more than their hosts tend to be locally adapted (Gandon et al. 1996). The dispersion capacity of *P. infestans*, via airborne asexual sporangia containing the infective zoospores, is larger than the dispersion capacity of its sessile host *S. tuberosum* (Bourke 1964). Finally, the narrow host range of *P. infestans* in temperate countries should also favor local adaptation in this host-pathogen agro-ecosystem (Lajeunesse and Forbes 2002).

This study addressed the question of local adaptation of *Phytophthora infestans* populations to two potato cultivars cultivated in large scales of time and space in French production areas. To answer it, we performed a reciprocal cross-inoculation experiment between three pathogen populations and two host populations in order to measure aggressiveness of each pathogen population on sympatric and allopatric host populations.

## B. Materials and Methods

### B.1. *Phytophthora infestans* isolates

A total of 187 single-lesion isolates was sampled in 2004 and 2005 from two production areas and an experimental station. Field populations P-O and P-B were sampled in Western France and Northern France, respectively. Population P-O consisted of isolates collected in a circular area of approximately 10 km diameter, centered on the GPS point 48°22'N - 4°45'W, and dominated for many years by the susceptible cultivar Ostara. Population P-B included isolates collected in a circular area of approximately 80 km diameter, centered on the GPS point 50°24'N - 2°47'E, and dominated by the susceptible cultivar Bintje. A third population, ES, was collected in the INRA potato breeding station at Ploudaniel (48°30'N - 4°19'W), where there is no dominant cultivar. P-O isolates (24 isolates from 5 fields and 45 isolates from 10 fields in 2004 and 2005, respectively) were all collected from cv. Ostara, while P-B isolates (23 isolates from 7 fields and 41 isolates from 9 fields in 2004 and 2005, respectively) were from cv. Bintje. ES isolates were sampled from both Ostara (12 isolates in 2004 and 12 in 2005) and Bintje (14 isolates in 2004 and 16 in 2005).

In all three sampling areas, an additional collection was established from infected leaflets of Ostara and Bintje plants present in experimental plots. One hundred nineteen

single-lesion isolates were sampled from the three experimental plots during the two years, on the basis of approximately 10 isolates by cultivar, location and year.

Infected leaf tissue was collected each year during the first phase of the epidemic. Single-lesion isolates were established and maintained as axenic cultures on pea agar as previously described (Montarry et al 2006).

### B.2. Mating type determination

Since *P. infestans* is an heterothallic organism, isolates from opposite mating types (A1 and A2) need to be present simultaneously on the same plant/organ for the pathogen to undergo sexual reproduction. We therefore determined the mating type of each isolate by pairing on pea agar with known A1 and A2 testers, incubating in the dark at 18°C for 10 to 14 days, and observing cultures for oospore formation under a microscope (Shaw et al. 1985). Isolates forming oospores with the A1 tester were rated as A2 mating type and those that formed oospores with the A2 tester were rated as A1 mating type.

### B.3. Pathogenicity tests

#### *a. Potato plant material*

Plants were grown in 13 cm pots (one tuber per pot) filled with 1:1:1 sand-peat-compost mixture, in a glasshouse regulated at 15-20°C (night/day temperatures) and 16 h of photoperiod. Plants were watered with a nutrient solution (Hakaphos; NPK 15/10/15) once a week.

#### *b. Inoculum preparation*

Maintaining isolates as axenic cultures on agar media for extended periods can alter their aggressiveness; however, pathogenicity can be restored by reinfecting leaf tissue (Jeffrey et al. 1962; Jinks and Grindle 1963). Each isolate was thus multiplied separately on its own cultivar of origin to produce the inoculum used for aggressiveness determination. To this end, detached leaflets of potato cultivars Ostara and Bintje were collected from plants grown in the greenhouse for 6-8 weeks from healthy, certified seed tubers, and deposited on the lids of inverted Petri dishes containing 12 g.L<sup>-1</sup> water agar, acting as humid chambers. They were

infected by depositing a suspension of *P. infestans* sporangia collected by flooding a 3-week old culture with 10 ml sterile tap water and gently scraping the colony surface to remove sporangia. Before inoculation, sporangial suspensions were kept at 4°C for approximately 4 hours to promote zoospore liberation. After ten days of incubation in controlled conditions (18°C/15°C day/night temperatures, 16 h daylight), the sporangia produced on infected leaflets were collected in sterile water, and the concentration of the resulting were adjusted to  $5.10^4$  sporangia per mL using a haemocytometer.

*c. Aggressiveness quantification*

Each isolate was tested for aggressiveness on each cultivar (Ostara and Bintje), yielding sympatric and allopatric combinations (see Fig. 3-1). Six leaflets were detached from 6/8-week-old plants and placed abaxial face up on the lids of inverted Petri dishes containing 12 g.L<sup>-1</sup> water agar (two leaflets per dish). Each leaflet was infected by depositing a 20 µL drop of the sporangial suspension as close as possible to the leaflet centre. Inoculated leaflets were then incubated for seven days as described above. The latency period (LP) was determined by observing daily the apparition of sporangia. Seven days after inoculation, lesion size was measured in two perpendicular directions and lesion area (LA) was calculated assuming an elliptic shape. Then, leaflets were washed in 10 mL Isoton II (saline buffer), and the sporangia production (SP) per leaflet was determined with a Coulter Z2 counter (Beckman Coulter France, Villepinte, France). A composite aggressiveness index ( $A_i$ ) was calculated for each isolate and leaflet using the formula  $A_i = \ln(LA \times SP \times 1/LP)$ . This index is indicative of the epidemiological potential of an isolate. Similar aggressiveness indices have been used for this and other pathogens (Crute et al. 1987; Thakur and Shelly 1993; Day and Shattock 1997; Flier and Turkensteen 1999).

|                      | Host populations   |                   |
|----------------------|--|-------------------|
|                      | Bintje   | Ostara            |
| Pathogen populations | <p>P-B<br/>(n=23 for 2004 and n=51 for 2005)</p> <p>Sympatric</p>  | <p>Allopatric</p> |
|                      | <p>P-O<br/>(n=24 for 2004 and n=45 for 2005)</p> <p>Allopatric</p> | <p>Sympatric</p>  |
|                      | <p>ES<br/>(n=26 for 2004 and n=28 for 2005)</p> <p>Allopatric</p>  | <p>Allopatric</p> |

**Figure 3-1:** Schematic representation of the cross-inoculation experiment design showing the sympatric and allopatric combinations between populations of *Phytophthora infestans* and its host plant *Solanum tuberosum*. P-B is the pathogen population from the production area dominated by cultivar Bintje, P-O is the pathogen populations from the production area dominated by cultivar Ostara and ES is the pathogen population from the experimental station (without a dominant cultivar).



B.4. Molecular characterization

P-B, P-O and ES isolates were grown in pea broth autoclaved for 20 min at 120°C. After 10 to 15 days of incubation at 18°C, mycelium was washed three times in sterile water, and lyophilized. DNA was extracted as described by Lebreton et al. 1998 and stored in TE buffer containing 10 M Tris-HCL and 0.1 M EDTA (pH 8.0). DNA concentration and purity were estimated using a spectrofluorimeter (SpectraMax M2).

Microsatellite analyses were performed at 10 polymorphic loci: Pi4B, Pi4G and PiG11 developed by Knapova and Gisi (2002) and Pi02, Pi04, Pi16, Pi33, Pi56, Pi63 and Pi70 recently developed by Lees et al. (2006). Microsatellite Polymerase Chain Reactions (PCR) were performed in a 12.5 µL volume containing between 20 and 200 ng of DNA of *P. infestans*, 2.5 µL of 5X PCR Buffer (Promega), 0.3 mM of each dNTP, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.3 µM each of forward and reverse primers, and 1.25 U of Taq DNA polymerase (GoTaq® flexi DNA polymerase, Promega). PCR was performed in a MJ Research thermocycler under the following conditions: the PCR started with a cycle of 2 min at 95°C, followed by 30 cycles of 20 s at 95°C, 25 s at 56°C (for PiG11), 58°C (for Pi02, Pi04, Pi16, Pi33, Pi56, Pi63, Pi70 and Pi4B) or 60°C (for Pi4G) and 60 s at 72°C, and finished with an elongation cycle of 5 min at 72°C. In order to detect simultaneously the alleles at several loci, primers were labeled with three fluorescent dyes: FAM (PiG11, Pi33, Pi 63, Pi70, Pi02, and Pi4B), NED (Pi56, Pi04, Pi4G) and HEX (Pi16). Amplification products were pooled into three groups, based on expected allele sizes: PiG11, Pi56 and Pi33; Pi63, Pi04, and Pi70; and Pi02, Pi4G, Pi16 and Pi4B, respectively. Ten µL samples, comprising 9.84 µL of deionized formamide Hi-Di™ (Applied Biosystems), 0.06 µL of 400 HD ROX™ Size standard (Applied Biosystems), and 0.1 µL of PCR multiplexed product, were loaded into an ABI Prism 3130xl DNA sequencer run according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems). DNA fragments were automatically sized with the GeneMapper™ 3.5 software.

B.5. Data analyses*a. Molecular data*

A number of isolates showed three or four alleles at one of more of the ten microsatellite loci, confirming the extensive variation in ploidy in European *Phytophthora infestans* populations (Tooley and Therrien 1987). Since allele detection was not quantitative,

it was impossible to adequately estimate allele frequencies. The microsatellite data were thus used as multilocus fingerprints, reflecting the presence or absence of each allele at each locus for each isolate. The resulting binary matrix was subjected to a cluster analysis with the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA), with Dice's coefficient as a metric (Nei and Li 1979), using the BioNumerics software (Applied Maths BVBA, Kortrijk, Belgium). Cophenetic correlations were calculated for each node to estimate the stability of clusters. A principal components analysis (PCA) of the data was performed, using the BioNumerics software, in order to visualize groupings among individual genotypes.

Diversity was estimated for each population using the Shannon index (Sheldon 1969), calculated as:

$$H_s = - \sum_j (p_j \ln p_j),$$

where  $p_j$  is the frequency of the  $j$ th genotype in the population. Diversities between populations were statistically tested using a two-tailed t-test (Hutcheson 1970).

Direct pairwise comparisons of populations were performed using the Rogers index (Groth and Roelfs, 1987), calculated as:

$$H_R = 0.5 \sum_j |p_{j1} - p_{j2}|,$$

where  $p_{j1}$  and  $p_{j2}$  represent the frequencies of genotype  $j$  in population 1 and in population 2, respectively, for all genotypes present in population 1 and(or) population 2.  $H_R$  varies from 0, when all genotypes are present at equal frequencies in the two populations, to 1, when the two populations do not share any single genotype. Intermediate values of  $H_R$  arise either from very dissimilar frequencies of the same genotype in the two populations, from the presence of some different genotypes between the populations, or from a combination of both (Andrison 1994).

#### *b. Aggressiveness data*

The effects of pathogen population (site of sampling), host population (test cultivar) and their interaction on aggressiveness indexes relative to P-B, P-O and ES isolates were tested for each year through an analysis of variance (ANOVA), using the GLM procedure in the STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM SOFTWARE (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Contrast tests allowed 'home vs. away' (within rows in Fig 3-1) and 'local vs. foreign' (across rows in Fig 3-1) tests.

To differentiate between adaptation to sites and to cultivars, aggressiveness data from isolates sampled in experimental field plots were analyzed using a second ANOVA model. The effects of pathogen population (site of sampling), cultivar of origin, and host population (test

cultivar), as well as their two-way and three-way interactions, on aggressiveness indexes were tested separately for year.

A third two way ANOVA was used to explore the relationship between aggressiveness and genotypic structure by tested cluster effect, host population effect and the corresponding two-way interaction.

When significant effects were detected, means values were compared with the Student-Newman-Keuls test ( $\alpha=0.05$ ).

## C. Results

### C.1. Mating type

All 207 isolates from western France (96 in 2004 and 111 in 2005), including those from P-O, ES and from the experimental plots at these sites, belonged to the A1 mating type, except one isolate collected in 2004 at the experimental station. Conversely, the 99 isolates from northern France (39 in 2004 and 60 in 2005) included a significant proportion of A2 isolates (20.5% in 2004 and 16.7% in 2005). Despite similar overall frequencies in both years, A2 isolates were found in only two of the seven fields sampled in 2004, but were recovered from all nine fields sampled in 2005.

### C.2. Genotypic structure

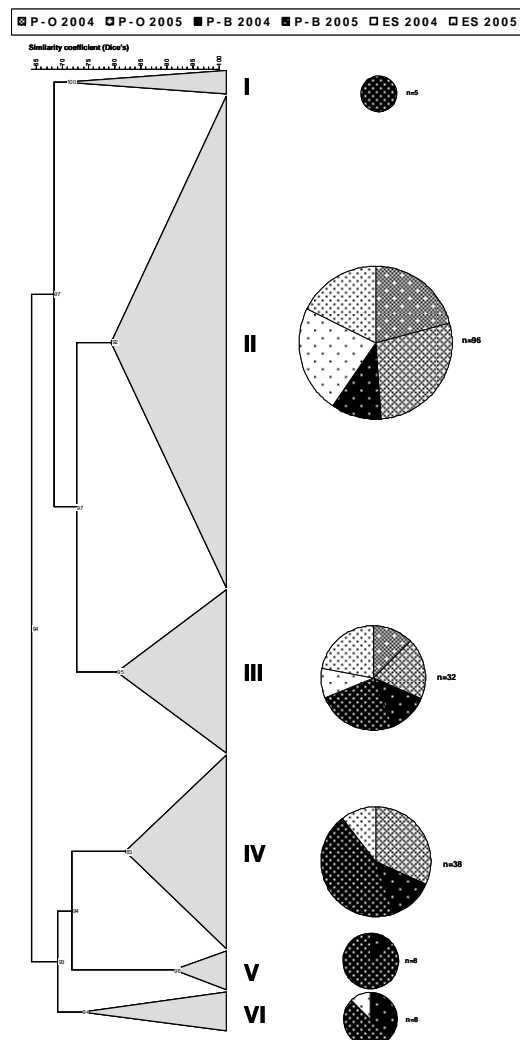
#### *a. Genotypic diversity*

Seventy eight genotypes were found among the 187 isolates of *P. infestans* tested. There was no significant difference in overall genotypic diversity between the two years ( $H_s = 3.168$  in 2004 and  $H_s = 3.228$  in 2005;  $t_{173} = 0.31$ ,  $P = 0.7594$ ). However, the P-B population ( $H_s = 3.337$ ) was significantly more diverse than P-O ( $H_s = 2.497$ ;  $t_{121} = 4.03$ ,  $P < 0.0001$ ) and ES ( $H_s = 2.819$ ;  $t_{99} = 2.48$ ,  $P = 0.0147$ ) populations.

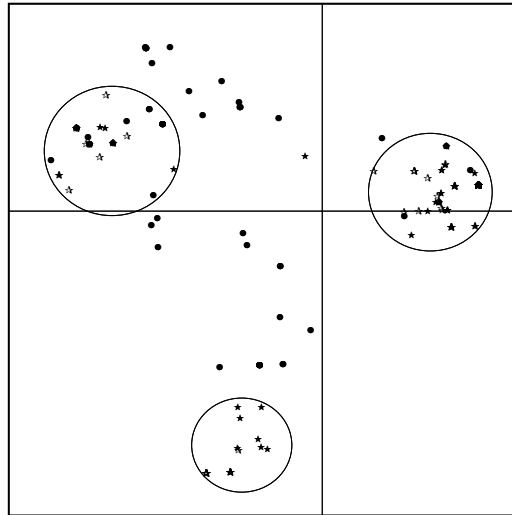
Pairwise comparisons of populations using the Rogers index revealed important variations in genotype frequencies between years, as well as between sites in a given year ( $H_r$  always greater than 0.5). Populations P-O and ES were more similar to one another ( $H_r_{P-O/ES} = 0.561$ ) than they were with P-B ( $H_r_{P-O/P-B} = 0.834$  and  $H_r_{ES/P-B} = 0.888$ ).

*b. Clustering*

Forty-five different alleles were identified over the 10 microsatellite loci. The phenetic analysis of the multilocus fingerprints revealed six clusters (see Fig. 3-2). Interestingly, cluster V was composed only of A2 mating type isolates, although A2 isolates were also found in all other phenons. The largest genotypic distance between isolates, based on Dice's coefficient, was 64.15%. With one exception, all P-O and ES isolates were present in only three different phenons (II, III and IV); the only exception was the A2 isolate from ES, which belonged to cluster VI. By contrast, P-B isolates were distributed across all six clusters. This distribution pattern was confirmed by the PCA plot (see Fig. 3-3). Some genotypes were detected in only one of the two years, suggesting an extinction-colonization dynamic due to genetic drift during the winter.



**Figure 3-2:** Clustering of *Phytophthora infestans* genotypes in populations P-B, P-O and ES from two consecutive years (2004 and 2005). Genotypic distances between clusters were estimated using an UPGMA algorithm applied to the matrix of Dice similarity index, based on allele distributions at ten polymorphic microsatellite loci. Figures at each node of the tree are cophenetic correlations.



**Figure 3-3:** Principal components analysis showing the distribution of phenotypes from populations P-B (black circles), P-O (white stars) and ES (black stars), computed from the distribution matrix of 45 polymorphic alleles from ten microsatellite loci. The first axis (X) represents 41.7% of the total variance and the second axis (Y) represents 17% of the total variance.

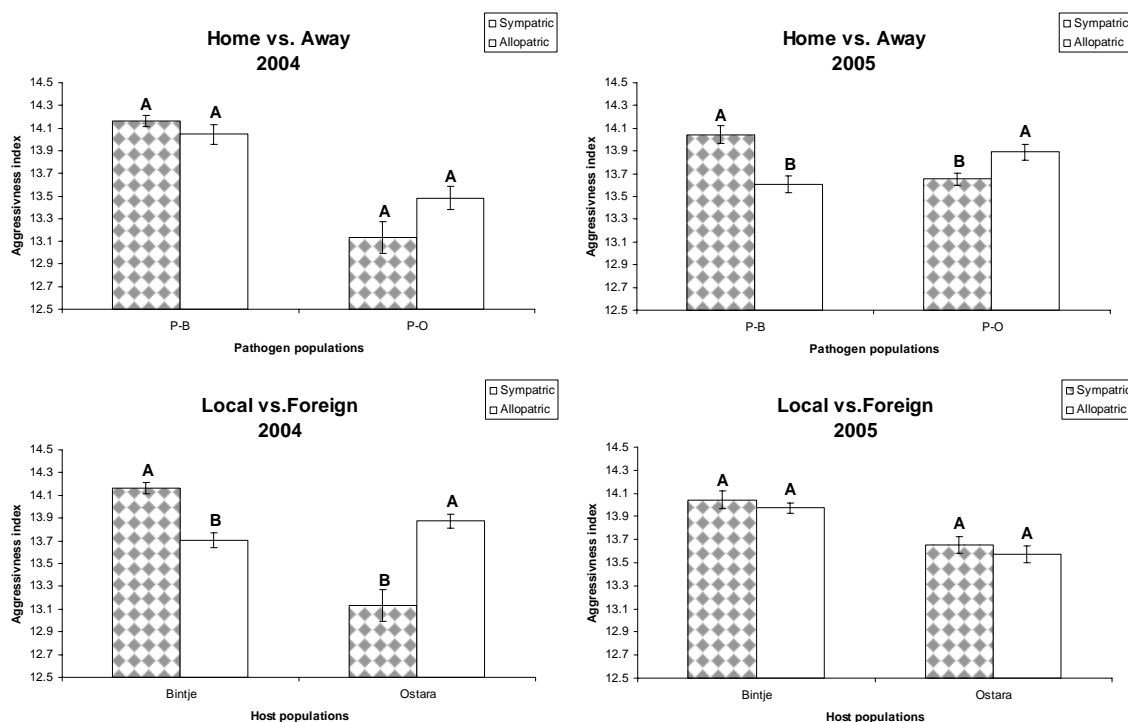
### C.3. Aggressiveness

#### *a. Local adaptation of pathogen populations*

The absence of interaction between host and pathogen populations for each year (see Table 1) indicated that the three pathogen populations P-B, P-O and ES ranked the two host cultivars (Bintje and Ostara) identically. P-B and P-O populations were more aggressive on Bintje. This was also true for the ES population, where there was no sympatric cultivar: in 2004,  $A_i = 13.911 \pm 0.040$  on Bintje vs.  $A_i = 13.725 \pm 0.073$  on Ostara ( $F_{1,50} = 5.01$ ;  $P = 0.0297$ ); and in 2005,  $A_i = 14.105 \pm 0.077$  on Bintje vs.  $A_i = 13.525 \pm 0.113$  on Ostara ( $F_{1,54} = 18.09$ ;  $P < 0.0001$ ). As a consequence, the contrast tests for aggressiveness differences on their own (home) versus other host populations (away) showed a higher aggressiveness of P-B on its sympatric host and of P-O on the allopatric host, although the differences were only significant in 2005 (see Table 3-1 and Fig. 3-4). The higher aggressiveness of all three populations to Bintje also accounts for the better performance of sympatric compared to allopatric isolates on this cultivar, and of allopatric compared to sympatric isolates on Ostara in 2004; contrast tests for aggressiveness differences of resident (local) versus non-resident pathogen populations (foreign) were not significant in 2005 (see Table 3-1 and Fig. 3-4).

**Table 3-1:** Analyses of variance for aggressiveness index in each year, 2004 and 2005, using the GLM procedure in the SAS software. Sources of variation are the pathogen population effect, the host population effect and the corresponding two-way interaction. Contrasts show the Home vs. Away comparisons and the Local vs. Foreign comparisons. The statistically significant effects are indicated by stars (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

| Source                      | 2004 |             |         |        |     | 2005 |             |         |        |     |
|-----------------------------|------|-------------|---------|--------|-----|------|-------------|---------|--------|-----|
|                             | DF   | Mean Square | F value | Pr>F   |     | DF   | Mean Square | F value | Pr>F   |     |
| <b>Main effects:</b>        |      |             |         |        |     |      |             |         |        |     |
| pathogen                    | 2    | 7,6622      | 41,00   | <.0001 | *** | 2    | 0,0667      | 0,28    | 0,7563 |     |
| host                        | 1    | 1,7108      | 9,15    | 0,0030 | **  | 1    | 9,5799      | 40,20   | <.0001 | *** |
| <b>Interaction effects:</b> |      |             |         |        |     |      |             |         |        |     |
| pathogen * host             | 2    | 0,1659      | 0,89    | 0,4139 |     | 2    | 0,5410      | 2,27    | 0,1057 |     |
| Error                       | 140  | 0,1869      |         |        |     | 222  | 0,2383      |         |        |     |
| <b>Contrasts:</b>           |      |             |         |        |     |      |             |         |        |     |
| Home vs Away (PA-O)         | 1    | 1,4499      | 4,02    | 0,0508 |     | 1    | 1,2639      | 6,67    | 0,0115 | *   |
| Home vs Away (PA-B)         | 1    | 0,1585      | 1,36    | 0,2499 |     | 1    | 3,9392      | 14,23   | 0,0003 | *** |
| Local vs Foreign (Bintje)   | 1    | 3,2832      | 21,91   | <.0001 | *** | 1    | 0,1319      | 0,76    | 0,3851 |     |
| Local vs Foreign (Ostara)   | 1    | 8,8383      | 32,93   | <.0001 | *** | 1    | 0,1770      | 0,58    | 0,4493 |     |



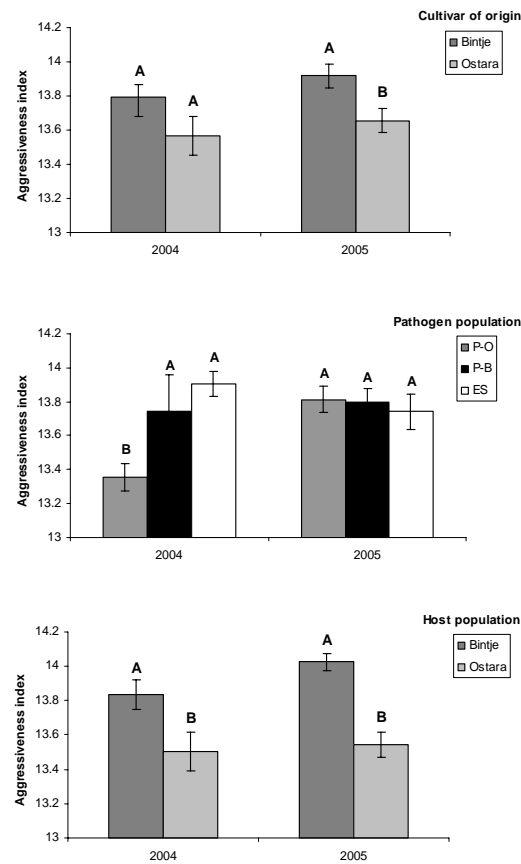
**Figure 3-4:** ‘Home vs. away’ and ‘local vs. foreign’ comparisons for each year, for three *P. infestans* populations tested on two potato cultivars. ‘Home vs. away’ comparisons show the aggressiveness index of the two pathogen populations (P-B and P-O) on sympatric and allopatric host cultivars (means  $\pm$  SE). ‘Local vs. foreign’ comparisons show the aggressiveness index of sympatric and allopatric pathogen populations on the two host cultivars Bintje and Ostara (means  $\pm$  SE). A and B above bars represent the homogeneous groups identified by the SNK test at the 5% threshold.

*b. Geographic origin vs. cultivar of origin*

In both years, isolates collected from Bintje in the experimental plots were more aggressive than isolates collected on Ostara in the same plots (see Fig. 3-5): this effect was highly significant in 2005 and marginally significant in 2004 (see Table 3-2). The absence of significant two-way and three-way interactions involving the cultivar of origin (see Table 3-2) showed that isolates from Bintje were more aggressive than those from Ostara, wherever the pathogen population came from and the cultivar on which it was tested. The aggressiveness data relative to isolates from experimental plots also showed that isolates were more aggressive on Bintje than on Ostara in both years, and that isolates from the plots established in the Ostara production area were significantly less aggressive than others in 2004 (see Fig. 3-5). These effects were exactly concordant with those observed in the populations from agricultural fields (see Table 3-2).

**Table 3-2: Analyses of variance for aggressiveness index in each year, 2004 and 2005, for isolates from experimental field plots in each location, using the GLM procedure in the SAS software. Sources of variation are the cultivar of origin effect, the pathogen population effect, the host population effect and all corresponding interactions. The statistically significant effects are indicated by stars (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).**

| Source                      | 2004 |             |         |        |    | 2005 |             |         |        |    |
|-----------------------------|------|-------------|---------|--------|----|------|-------------|---------|--------|----|
|                             | DF   | Mean Square | F value | Pr>F   |    | DF   | Mean Square | F value | Pr>F   |    |
| <b>Main effects:</b>        |      |             |         |        |    |      |             |         |        |    |
| cultivar of origin (1)      | 1    | 1.7831      | 3.22    | 0.0756 |    | 1    | 1.9058      | 8.85    | 0.0037 | ** |
| pathogen population (2)     | 2    | 3.4204      | 6.17    | 0.0029 | ** | 2    | 0.0317      | 0.15    | 0.8631 |    |
| host population (3)         | 1    | 3.0412      | 5.49    | 0.0209 | *  | 1    | 6.6784      | 31.02   | <.0001 | ** |
| <b>Interaction effects:</b> |      |             |         |        |    |      |             |         |        |    |
| (1)*(2)                     | 2    | 1.4565      | 2.63    | 0.0767 |    | 2    | 0.1914      | 0.89    | 0.4142 |    |
| (1)*(3)                     | 1    | 0.0143      | 0.03    | 0.8726 |    | 1    | 0.1966      | 0.91    | 0.3415 |    |
| (2)*(3)                     | 2    | 0.0102      | 0.18    | 0.8326 |    | 2    | 0.4027      | 1.87    | 0.1593 |    |
| (1)*(2)*(3)                 | 2    | 0.1810      | 0.33    | 0.7222 |    | 2    | 0.0059      | 0.03    | 0.9732 |    |
| Error                       | 112  | 0.5544      |         |        |    | 102  | 0.2153      |         |        |    |



**Figure 3-5:** Aggressiveness index (means  $\pm$  SE) for each year (2004 and 2005) according to cultivars of origin, pathogen populations (site of sampling) and host populations (test cultivar) in *Phytophthora infestans* populations sampled in the experimental field plots. A and B above bars represent the homogeneous groups identified by the SNK test at the 5% threshold.

*c. Relationship between aggressiveness and genotypic structure*

Isolates from cluster V were significantly less aggressive than those in other clusters, accounting for the significant cluster effect ( $F_{5,362} = 2.44$ ,  $P = 0.0339$ ) in the ANOVA. All isolate clusters were more aggressive on the host population Bintje than on the host population Ostara, explaining the absence of a significant interaction between clusters and host populations ( $F_{5,362} = 0.76$ ,  $P = 0.5824$ ).



## D. Discussion

The general objective of this paper was to test the hypothesis of local adaptation in *Phytophthora infestans* and its cultivated host *Solanum tuberosum* at the spatial scale of potato production areas in France. We used reciprocal cross-inoculation experiments in controlled conditions to test the local adaptation hypothesis. This design is more powerful than transplant experiments, where either hosts or parasites are transplanted from one population to another, as it better avoids the confusion between environmental conditions and genetic composition of the populations. This is important, since parasites or hosts may perform better in their home site simply because they have adapted to local abiotic environment (temperature, light intensity, humidity...) rather than to their local hosts and parasites, respectively (Roy 1998).

At both the local and regional scales, the adaptive pattern emerging from the data is a general adaptation of pathogen populations to the most common host genotype (Bintje), corresponding to a single specialist phenotype of the pathogen optimally adapted to one host cultivar and less well adapted to others. This conclusion accounts for the observations relative to both field and experimental plot populations, which show i) a higher aggressiveness of all populations on Bintje than on Ostara and ii) a higher aggressiveness of populations collected on Bintje than those collected on Ostara, irrespective of the site of collection. The absence of interaction between pathogen and host populations shows that there is no local adaptation (or maladaptation) in this pathosystem at the spatial scales studied here.

A previous study (Montarry et al. 2006) had shown that at the field plot scale, *P. infestans* populations from a susceptible potato cultivar (Bintje) were more aggressive than those from a partially resistant cultivar (Désirée), with no differential adaptation to each host. This could be due to either adaptation to Bintje because of its susceptibility, or because of its overall prevalence in the host population. The pattern observed here, similar to that in Montarry et al's work, cannot be explained by differences in intrinsic cultivar susceptibility between host cultivars Bintje and Ostara. Indeed, the pattern of general adaptation was supported by the 'local vs. foreign' comparisons made on the field populations, a test that is not dependent on susceptibility differences between hosts as it involves a single host at a time (Thrall et al. 2002). Furthermore, parasite performance does not necessarily covary with degree of damage to the host (Kaltz and Shykoff 1998): locally adapted parasites should be maximally infectious on local hosts, but not necessarily cause greatest damage (Kirchner and

Roy 2002; Dybdahl and Storfer 2003). This is the case here: although isolates were more aggressive on Bintje than on Ostara, there was no difference between diseases progress curves (percentage of foliage destruction according to time) on both cultivars in each (two years and three locations) experimental plots (data not shown). This supports the view that both cultivars were equally susceptible to all pathogen populations in the field (polycyclic epidemics), despite the differences in aggressiveness observed in the controlled condition experiments (monocyclic tests).

The degree to which individual populations show local adaptation can be correlated with their characteristics such as size, age, demography, genetic isolation, and habitat quality. Local adaptation is most likely when differences in size and quality of habitats are small (Kisdi 2002). Here, the general adaptation to cultivar Bintje may well result from the stronger selection pressure applied by Bintje on *P. infestans* populations, relative to that caused by Ostara. Indeed, the production area dominated by Bintje (approximately 20,000 km<sup>2</sup>) is larger than the one dominated by Ostara (approximately 300 km<sup>2</sup>), and the duration of cultivation of Bintje (22±1 weeks) is longer than that of Ostara (16±1 weeks). Moreover, Bintje can be found in all the national territory, in agricultural fields or in private gardens, whereas Ostara is more strictly restricted to its small production area.

The pattern of general adaptation observed here is most likely the consequence of extensive gene flow between populations across regions, coupled with predominant selection by Bintje. This hypothesis is consistent with the repartition of genotypes from P-B population into all phenetic clusters, explaining the lack of a strong structure in the French *P. infestans* populations and confirming previous reports (Lebreton et al. 1998). Because only genotypes from P-B were found in all clusters, we can postulate that the population has a source-sink structure, with P-B being the source and P-O the sink. When migration among populations is not random, the sink populations may not be able to evolve local adaptation because they are flooded with migrants (Dias 1996; Kawecki 2004). Such an asymmetry in gene flow can be caused by ecological factors, or simply because passive diffusion moves individuals from favorable to less favorable habitats more often than the reverse, since favorable habitats tend to have more individuals (Hastings 1983).

The absence of a local adaptation pattern does not necessarily mean that the process of divergent selection is not operating (Kawecki and Ebert 2004). Metapopulation dynamics may strongly interfere with local selection process, and temporal variation in selection prevents local adaptation (Kassen 2002). Therefore, detecting local adaptation in metapopulations, where colonization, extinction and genetic drift play significant roles (Hanski 1999), becomes

problematic (Gandon and Van Zandt 1998; Kawecki and Ebert 2004). The large extinction rates during winter in *P. infestans* (Shattock 1976; Zwankhuizen et al. 2000) highlight the importance of genetic drift in this pathogen. The large variation in local frequencies of pathogen genotypes over successive seasons observed here and in previous work (Lebreton et al. 1998) also point to a significant effect of genetic drift in shaping local population structures, and thus prevent local adaptation to be detected at that scale (Thrall and Burdon 1997; Burdon and Thrall 2000). Large parasite dispersal rates decrease the degree of adaptation of the parasite to local hosts by introducing locally maladapted genotypes into each parasite population; as a consequence, if migration completely swamps local dynamics, local adaptation may only be apparent at higher geographical scales (Kaltz and Shykoff 1998, Gandon and Van Zandt 1998).

The local adaptation process provides an insight into the spatial scale at which (co)evolutionary dynamics occur. A number of studies report no difference between parasite performance on sympatric and allopatric hosts (Parker 1989; Ennos and McConnell 1995; Davelos et al. 1996; Dufva 1996), possibly because local adaptation may be present at a larger or a smaller scale than the investigation considers. The host-pathogen association studied here confirms hypotheses, highlighted above, that large pathogen dispersal rates and important genetic drift, corresponding to a limited off-season survival, could lead to a local adaptation pattern detectable only at a large spatial scale. In the association between *P. infestans* populations and potato cultivars, local adaptation was not detectable at spatial scales ranging from experimental plots (Montarry et al 2006, and this work) to regions several tens of km wide. However, it was observed between geographically remote populations from France and Morocco: isolates from Moroccan *P. infestans* populations were more aggressive on the partially resistant cv. Désirée, which is the dominant cultivar in Morocco, than on the susceptible cv. Bintje, which is the dominant cultivar in France, whereas isolates from French *P. infestans* populations were more aggressive on cv. Bintje than on cv. Désirée (Andrison et al. 2007). This pattern is consistent with *P. infestans* life history traits – long distance migration of asexual spores, strong genetic drift during inter-epidemic phases, and response to selection-, which should prevent local adaptation in locally or regionally connected populations but favor them between genetically isolated populations (Kaltz and Shykoff 1998). The unraveling of adaptive patterns at each of these spatial scales can now be put to use for a more efficient management of the disease by appropriate deployment strategies of potato cultivars.

## E. Acknowledgements

We thank L. Dubois, R. Pellé and J.M. Abiven for establishing field plots and help with sampling; E. Lesné for establishing isolate collections, H. Douchy and B. Marquer for participating in the biological tests, G. Mialdéa for helping in molecular characterization. The molecular characterization was performed on the Ouest-Genopole® facilities. J.M. is supported by a PhD grant from Bretagne-Plants, acting on behalf of the ACVNPT (Association des Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre).

## F. References

- Andriveau, D. 1994. Races of *Phytophthora infestans* in France, 1991-1993. Potato Res. 37: 279-286.
- Andriveau, D, F. Pilet, J. Montarry, M. Hafidi, R. Corbière, E.H. Achbani, R. Pellé and D. Ellissèche. 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. Phytopathology, in press.
- Bourke, P.M.A. 1964. Emergence of potato blight, 1843-46. Nature 203: 805-808.
- Brown, J.K.M. 1994. Chance and selection in the evolution of barley mildew. Trends Microbiol. 2: 470-475.
- Burdon, J.J. and P.H. Thrall. 2000. Coevolution at multiple spatial scales: *Linum marginale-Melampsora lini*; from the individual to the species. Evol. Ecol. 14: 261-281.
- Crute, I.R., J.M. Norwood and P.L. Gordon. 1987. The occurrence, characteristics and distribution in the United Kingdom of resistance to phenylamide fungicides in *Bremia lactucae* (lettuce downy mildew). Plant Pathol. 36: 297-315.
- Davelos, A.L., H.M. Alexander and N.A. Slade. 1996. Ecological genetic interactions between a clonal host plant (*Spartina pectinata*) and associated rust fungi (*Puccinia seymouriana* and *Puccinia sparganioides*). Oecologia 105: 205-213.
- Day, J.P. and R.C. Shattock. 1997. Aggressiveness and other factors relating to displacement of population of *Phytophthora infestans* in England and Wales. Eur. J. Plant Pathol. 103: 379-391.
- Delmotte, F., E. Bucheli and J. Shykoff. 1999. Host and parasite population structure in a natural plant-pathogen system. Heredity 82: 300-308.

- Dias, P.C. 1996. Sources and sinks in population biology. *Trends Ecol. Evol.* 11: 326-330.
- Dufva, R. 1996. Sympatric and allopatric combinations of hen fleas and great tits: a test of local adaptation hypothesis. *J. Evol. Biol.* 9: 505-510.
- Dybdahl, M.F. and A. Storfer. 2003. Parasite local adaptation: red queen versus suicide king. *Trends Ecol. Evol.* 18: 523-530.
- Ebert, D. and W.D. Hamilton. 1996. Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. *Trends Ecol. Evol.* 11: 79-82.
- Ennos, R.A. and K.C. McConnell. 1995. Using genetic markers to investigate natural selection in fungal populations. *Can. J. Bot.* 73: S302-S310.
- Flier, W.G. and L.J. Turkensteen. 1999. Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 381-388.
- Fry, J.D. 1996. The evolution of host specialization: are trade-offs overrated? *Am. Nat.* 148: S84-S107.
- Gandon, S. and P.A. Van Zandt. 1998. Local adaptation and host-parasite interactions. *Trends Ecol. Evol.* 13: 214-216.
- Gandon, S., Y. Capowiez, A. Dubois, Y. Michalakis and I. Olivieri. 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proc. R. Soc. London B* 263: 1003-1009.
- Gandon, S., D. Ebert, I. Olivieri and Y. Michalakis. 1998. Differential adaptation in spatially heterogeneous environments and host-parasite coevolution. Pp. 325-340 in S. Mopper and S. Strauss, eds. *Genetic Structure and Local Adaptation in Natural Insect Populations*. Chapman and Hall, London.
- Groth, J.V. and A.P. Roelfs. 1987. The concept and measurement of phenotypic diversity in *Puccinia graminis* on wheat. *Phytopathology* 77: 1395-1399.
- Hamilton, W.D., R. Axelrod and R. Tanese. 1990. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3566-3573.
- Hanski, I. 1999. *Metapopulation Ecology*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Harrison, J.G. 1992. Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage – a review. *Plant Pathol.* 41: 384-416.
- Hastings, A. 1983. Can spatial selection alone lead to selection for dispersal? *Theor. Pop. Biol.* 24: 244-251.
- Hutcheson, K. 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *J. Theor. Biol.* 29:151-154.

- Jarosz, A.M. and A.L. Davelos. 1995. Effects of disease in wild populations and the evolution of pathogen aggressiveness. *New Phytol.* 129: 371-387.
- Jeffrey, S.I.B, J.L. Jinks and M. Grindle. 1962. Intraracial variation in *Phytophthora infestans* and field resistance to potato blight. *Genetica* 32: 323-338.
- Jinks, J.L. and M. Grindle. 1963. Changes induced by training in *Phytophthora infestans*. *Heredity* 18: 245-264.
- Kaltz, O. and J. A. Shykoff. 1998. Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity* 81: 361-370.
- Kassen, R. 2002. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* 15: 173-190.
- Kawecki, T.J. 1998. Red Queen meets Santa Rosalia: arms races and the evolution of host specialization in organisms with parasitic lifestyles. *Am. Nat.* 152: 635-651.
- . 2004. Source-sink population dynamics and its evolutionary consequences. Pp. 387-414 in I. Hanski. and O.E. Gaggiotti, eds. *Metapopulation Dynamics*. Academic Press Oxford, Oxford.
- Kawecki, T.J. and D. Ebert. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7: 1225-1241.
- Kirchner, J.W. and B.A. Roy. 2002. Evolutionary implications of host-pathogen specificity: fitness consequences of pathogen virulence traits. *Evol. Ecol. Res.* 4: 27-48.
- Kisdi, E. 2002. Dispersal: risk spreading versus local adaptation. *Am. Nat.* 159: 579-596.
- Knapova, G. and U. Gisi. 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathol.* 51: 641-653.
- Ladle, R.J. (1992) Parasite and sex: catching the Red Queen. *Trends Ecol. Evol.* 7: 405-408.
- Lajeunesse, M.J. and M.R. Forbes. 2002. Host range and local parasite adaptation. *Proc. Biol. Sci.* 269: 703-710.
- Lebreton L., C. Laurent and D. Andrivon D. 1998. Evolution of *Phytophthora infestans* populations in the two most important potato production areas in France during 1992-1996. *Plant Pathol.* 47: 427-439.
- Lees, A.K., R. Wattier, D.S. Shaw, L. Sullivan, N.A. Williams and D.E.L. Cooke. 2006. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathol.* 55: 311-319.
- Lively, C.M. 1996. Host-parasite coevolution and sex. *Bioscience* 46: 107-114.
- Mc Donald, B.A. and C. Linde. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 349-379.

- Montarry, J., R. Corbière, S. Lesueur, I. Glais and D. Andrivon. 2006. Does selection by resistant host trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *J. Evol. Biol.* 19: 522-531.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Parker, M.A. 1989. Disease impact and local genetic diversity in the clonal plant *Podophyllum peltatum*. *Evolution* 45: 1209-1217.
- Poulin, R. and C. Combes. 1999. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol. Today* 15, 474-475.
- Roy, B.A. 1998. Differentiating the effects of origin and frequency in reciprocal transplant experiments used to test negative frequency-dependent selection hypothesis. *Oecologia* 115: 73-83.
- Shattock, R.C. 1976. Winter survival of field isolates of *Phytophthora infestans* in seed tubers and development of primarily infected plants. *Ann. Appl. Biol.* 84: 273-274.
- Shaw, D.S., A. M. Fyfe, P.G. Hibberd and M.A. Abdel-Sattar. 1985. Occurrence of the rare A2 mating type of *Phytophthora infestans* on imported Egyptian potatoes and the production of sexual progeny with A1 mating types from the UK. *Plant Pathol.* 34: 552-556.
- Sheldon, A.L. 1969. Equability indices: dependence on the species count. *Ecology* 50: 466-467.
- Thakur, R.P. and K.G. Shelly. 1993. Variation in pathogenicity among single-oospore isolates of *Sclerospora graminicola*, the causal organism of downy mildew in pearl millet. *Plant Pathol.* 42: 715-721.
- Thrall, P.H. and J.J. Burdon. 1997. Host-pathogen dynamics in a metapopulation context: the ecological and evolutionary consequences of being spatial. *J. Ecol.* 85: 743-753.
- Thrall, P.H., J.J. Burdon and J.D. Bever. 2002. Local adaptation in the *Linum marginale* - *Melampsora lini* host - pathogen interaction. *Evolution* 56: 1340-1351.
- Tooley, P.W. and C.D. Therrien. 1987. Cytophotometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolates of *Phytophthora infestans*. *Exp. Mycol.* 11: 19-26.
- Vanderplank, J.E. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press, New York.
- Van Valen, L.M. 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theor.* 1: 1-30.

Zwankhuizen, M.J., F. Govers and J.C. Zadocks. 2000. Inoculum sources and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in Southern Flevoland, the Netherlands. Eur. J. Plant Pathol. 106: 667-680.





## ***Chapitre 4***

### ***Effets de la phase de survie hivernale sur la structure des populations pathogènes***

## EFFETS DE LA PHASE DE SURVIE HIVERNALE SUR LA STRUCTURE DES POPULATIONS PATHOGENES

Nous avons vu dans le chapitre précédent l'importance des flux de gènes mais également de la dérive génétique dans la réponse adaptative des populations pathogènes au déploiement de son hôte, le patron d'adaptation locale n'étant détectable qu'à une très large échelle spatiale lorsque ces forces évolutives sont importantes.

Les forts taux d'extinction pendant l'hiver chez *P. infestans*, et la grande variation dans les fréquences locales des génotypes pathogènes entre deux saisons successives, observée lors de ce travail de thèse et dans des travaux antérieurs, soulignent le fait que la dérive génétique contribue largement à façonner les populations locales de *P. infestans*. Ces observations montrent l'importance d'explorer la sélection imposée aux populations pathogènes pendant la phase inter-épidémique pour appréhender correctement leur évolution au cours de cycles culturels successifs. L'évolution des populations pathogènes est en effet fortement dépendante de la sélection imposée par les plantes hôtes pendant les épidémies, mais la compréhension des phénomènes de sélection imposés à ces populations entre les épidémies est indispensable pour prendre en compte la récurrence des épidémies dans la compréhension du fonctionnement des pathosystèmes dans leur globalité.

En France, où la reproduction sexuée de *P. infestans* n'a jamais été observée, l'hivernage du parasite se produit essentiellement sous forme de mycélium présent dans les tubercules infectés restant dans les sols et dans les tas de déchets laissés à proximité des champs cultivés. Dans cette situation, on peut supposer que les souches les plus agressives détruisent plus rapidement les tubercules qui leur permettent de survivre pendant l'hiver, ce qui entraînerait leur contre-sélection.

L'objectif de ce chapitre sera donc de tester l'hypothèse d'un trade-off entre agressivité pendant la phase épidémique et capacité de survie pendant l'hiver dans les populations clonales de *Phytophthora infestans*.

Des lots de tubercules, inoculés avec des souches d'agressivité connue sur feuillage (période de latence, taille de lésions et sporulation), ont été placés après la récolte (octobre

2004), en tas individualisés, dans trois sites (Finistère, Ille-et-Vilaine et Pas-de-Calais) représentant trois conditions hivernales différentes, et le pourcentage de tubercules en vie, estimé par leur capacité à produire de nouveaux germes, a été noté au printemps suivant.

**Les résultats rapportés dans ce chapitre font l’objet d’une publication dans *Functional Ecology* (soumise en Septembre 2006 – acceptée en Janvier 2007).**

## **Is there a trade-off between aggressiveness and over-winter survival in *Phytophthora infestans*?**

J. MONTARRY, R. CORBIERE & D. ANDRIVON\*

INRA, Agrocampus Rennes, UMR1099 BiO3P (Biology of Organisms and Populations applied to Plant Protection), F-35653 Le Rheu, France

\*Correspondence: Didier.Andrivon@rennes.inra.fr

Running headline: Trade-off during *P. infestans* winter survival

1. Selection during inter-epidemic stages is crucial for the evolution of pathogen populations. Trade-offs involving aggressiveness (quantitative pathogenicity) have rarely been explored in pathogens whose life cycle requires the disease-causing organism to change organs within the same host.
2. We investigated the existence of a trade-off between aggressiveness and survival in *Phytophthora infestans*, the pathogen causing potato late blight. In France, *P. infestans* behaves as an obligate biotroph, surviving in infected tubers. Aggressive isolates, which are favoured during the epidemic, may exhaust their nutrient supply too fast to bridge seasons, resulting in a possible trade-off between the two life stages.
3. We inoculated tubers with isolates possessing different aggressiveness levels, let them over-winter as outdoor piles at three different sites, and scored the proportion of live tubers in the following spring.
4. At two sites, infection caused early tuber sprouting, which can be seen as either a manipulation of the host by the pathogen or as an attempt by the host to escape.
5. Over-winter survival was higher for control than for inoculated tubers, but did not differ between tubers inoculated with different isolates. This suggests that aggressiveness should gradually increase in *P. infestans* populations, unless a trade-off occurs at another stage of the life cycle.

**Keywords:** fitness, host manipulation, pathogenicity, plant-pathogen co-evolution, potato late blight.

## A. Introduction

Plant pathologists define ‘aggressiveness’ as the amount of damage a parasite causes to its host, and we use this definition to avoid confusion with the qualitative ability of a pathogen to infect an host, which pathologists call ‘virulence’ (Vanderplank 1963). However, ecologists often use ‘virulence’ to mean the same as ‘aggressiveness’ in plant pathological terminology (Poulin & Combes 1999). Several evolutionary processes influence aggressiveness, and there may be trade-offs between transmission and aggressiveness (Anderson & May 1982; Frank 1996; Koella & Agnew 1999; Paul *et al.* 2004). Faster transmission is advantageous because it is equivalent to a greater reproductive rate. Although higher aggressiveness can be advantageous in the short term, as it maximizes the number of offspring within a given reproductive cycle, it can be disadvantageous in the long term, because it reduces resources available for future reproduction and decreases the expected life span. Parasites (particularly biotrophic parasites, which cannot survive for any prolonged period outside living host tissue) will therefore benefit from exploiting their hosts prudently (i.e. prolonging infection and avoiding killing the host), and selection therefore favours a balance between transmission and aggressiveness (Frank 1996). For each host-parasite interaction, there may be a specific pattern of host utilization that optimizes the parasite’s balance between rapid transmission and the time before the host dies (Anderson & May 1982; Ewald 1983).

In host-pathogen agro-ecosystems, the study of evolutionary forces shaping pathogen population structures is an important research topic. Selection by hosts is probably the most important evolutionary force (Mc Donald & Linde 2002), and it is also the force that can be most easily manipulated. Selective forces are much more frequently studied during epidemics, than during inter-epidemic stages of the parasite life cycle. In addition, the question of a trade-off in aggressiveness has rarely been addressed in situations where the life cycle requires parasites to change organs within the same host. Although many soil parasites have the ability to grow saprophytically on organic debris in the absence of living hosts (Bruehl 1987), those that lack this ability need living plant tissue to survive during the inter-epidemic phase, and this potential trade-off is therefore crucial.

Plant-fungal pathosystems constitute good experimental models for investigating selection processes, because the large population size, large number of pathogen generations in a calendar year and strong host-dependence imply that changes can occur over short time

scales (Brasier 1987). Such systems are also well suited for the analysis of trade-offs, as most pathogens of annual plants alternate between epidemic and survival phases. Besides answering key evolutionary questions, unravelling possible trade-offs between life stages in host-pathogen systems could provide new or improved strategies for the control of diseases.

Potato late blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, provides a good system to investigate such questions. Late blight is one of the most destructive diseases of the cultivated potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* L.). *Phytophthora infestans* is characterized by a primarily aerial life cycle with high multiplication rates (Harrison 1992) and its polycyclic epidemics allow rapid responses to selection. Between epidemics, the pathogen survives in the soil as sexual oospores or as mycelium in infected plant parts (Thrall *et al.* 1997). Oospores are able to survive for several years in the soil before reinfecting a potato crop (Drenth, Jansen & Govers 1995). Sexual reproduction requires the simultaneous presence of two mating types (A1 and A2). Before the 1980s, the A2 mating type was present only in Mexico, the centre of origin of late blight (Niederhauser 1991; Andrivon 1996), but since 1981 (Hohl & Iselin 1984) A2 isolates have appeared at highly variable frequencies in all potato-growing countries (see Fry *et al.* 1993; Goodwin 1997 for reviews). However, the A2 mating type is rare in France (Lebreton, Laurent & Andrivon 1998; Montarry *et al.* 2006) and, since there is no evidence of sexual recombination, French *P. infestans* populations are thought to survive as mycelium in tubers remaining either in the soil or in refuse piles near potato fields.

In nature the pathogen behaves as an obligate biotroph (Isaac 1992; Hammond-Kosack & Parker 2003), with no ability to survive saprotrophically (Andrivon 1995), although it can be isolated and maintained as axenic cultures on artificial media. Miniaturized tests are available to assay populations for aggressiveness (Andrivon *et al.* 2003; Flier, van den Bosch & Turkensteen 2003). The most aggressive isolates are not necessarily the fittest when a whole season or several seasons are considered. Thus, it is possible that highly pathogenic isolates, which will be favoured during the epidemic season, will be under negative selection pressure during the winter, due to their inability to survive in the absence of living plant tissue (Wastie 1991; Flier, Turkensteen & Mulder 1998). Intermediately aggressive isolates, which do not kill all infected tubers, would tend to survive better, and therefore be fitter, than aggressive strains which kill tubers before they sprout.

Asexual transmission of *P. infestans* genotypes from one epidemic season to the next requires infection of tubers by inoculum produced on infected foliage, which must be followed by over-winter survival within tubers, before development of diseased shoots from

infected tubers. Infection of tubers from foliage-born inoculum is primarily a passive event, with rain transporting spores from infected leaves and stems that have fallen to the ground (Robertson 1991). Although efficacy of infection depends on a number of factors, such as cultivar resistance and canopy architecture, tuber position within the ridge, soil type, temperature and moisture, disease severity and harvest time (Porter, Dasgupta & Johnson 2005), there is, to our knowledge, no direct evidence that, under the same conditions, different isolates are transmitted at different rates. Survival within tubers, which determines whether diseased shoots are produced, is more likely to be the stage where a trade-off might be observable, since *P. infestans* isolates show genetic variability in their pathogenicity to tubers (Flier, Turkensteen & Mulder 1998).

We investigated the possible trade-off between aggressiveness during the epidemic phase and the survival capacity during the winter in clonal populations of *Phytophthora infestans* by placing tubers inoculated with isolates possessing different aggressiveness levels on potato foliage in outside piles during the winter, and scoring the percentage of living tubers in the following spring.

## **B. Materials and methods**

### B.1. *Phytophthora infestans* isolates

Axenic cultures were established from 176 isolates, collected in 2004 from Finistère (Brittany, western France). Each single-lesion isolate was obtained by placing 1 cm<sup>2</sup> pieces of infected tissue on tuber slices of potato cultivar Bintje, kept in plastic trays for seven days at 15°C. Pure cultures were then obtained by transferring small pieces of mycelium growing on the upper side of the potato slice to pea agar supplemented with 200 mg.L<sup>-1</sup> ampicillin, 30 mg.L<sup>-1</sup> rifamycin, and 0.4 ml.L<sup>-1</sup> pimarinic. After approximately 10 days, growing colonies were transferred to pea agar without antibiotics, and subsequently maintained by serial transfer at 15°C.



B.2. Assessing foliar aggressiveness

Plants (cv. Bintje, which is highly susceptible to *P. infestans*) were grown in 13 cm pots (one healthy, certified seed tuber per pot) filled with 1:1:1 sand-peat-compost mixture, in a glasshouse regulated at 15-20°C (night/day temperatures) and 16 h of photoperiod. Plants were watered with a nutrient solution (Hakaphos; NPK 15/10/15, 150 mL/pot) once a week.

Detached leaflets were collected from plants grown in the greenhouse for 6-8 weeks and deposited on the lids of inverted Petri dishes containing 12 g.L<sup>-1</sup> water agar, acting as humid chambers. They were infected by depositing a suspension of *P. infestans* sporangia collected by flooding a 3-week old culture with 10 ml sterile tap water and gently scraping the colony surface to remove sporangia. After ten days of incubation in controlled conditions (18°C/15°C day/night temperatures, 16 h daylight), the sporangia produced on infected leaflets were collected in sterile water. Sporangial suspensions were adjusted to 5x10<sup>4</sup> sporangia per mL using a haemocytometer. Before inoculation, sporangial suspensions were kept at 4°C for approximately 4 hours to promote zoospore liberation. All 176 isolates were multiplied separately in this way to produce the inoculum used for aggressiveness determination.

Each isolate was tested for aggressiveness on cultivar Bintje. Six leaflets were detached from 6-8-week-old plants and placed abaxial face up on the lids of inverted Petri dishes containing 12 g.L<sup>-1</sup> water agar (two leaflets per dish). Each leaflet was infected by depositing a 20 µL drop of the sporangial suspension as close as possible to the leaflet centre. Inoculated leaflets were then incubated for seven days as described above. The latency period (LP) was determined by daily observations of the appearance of sporangia. Seven days after inoculation, lesion extension was measured in two perpendicular directions and lesion size (LS) was calculated from these measurements, assuming an elliptic shape. Leaflets were then washed in 10 mL Isoton II (saline buffer), and the sporangia production (SP) per leaflet was determined with a Coulter Z2 counter (Beckman Coulter France, Villepinte, France). A composite aggressiveness index ( $A_i$ ) was calculated for each isolate and leaflet using the formula  $A_i = \ln (LS \times SP \times 1/LP)$ . This index is indicative of the epidemiological potential of an isolate. Similar aggressiveness indices have been used for this and other pathogens (Crute, Norwood & Gordon 1987; Day & Shattock 1997; Flier & Turkensteen 1999; Thakur & Shelly 1993). Aggressiveness indexes in the collection of 176 isolates ranged from 12.48 to 14.74 (data not shown); the differences in aggressiveness indexes reflect up to five-fold differences

in SP and up to two-fold differences in LP and LS between the least and most aggressive isolates.

### B.3. Survival experiment

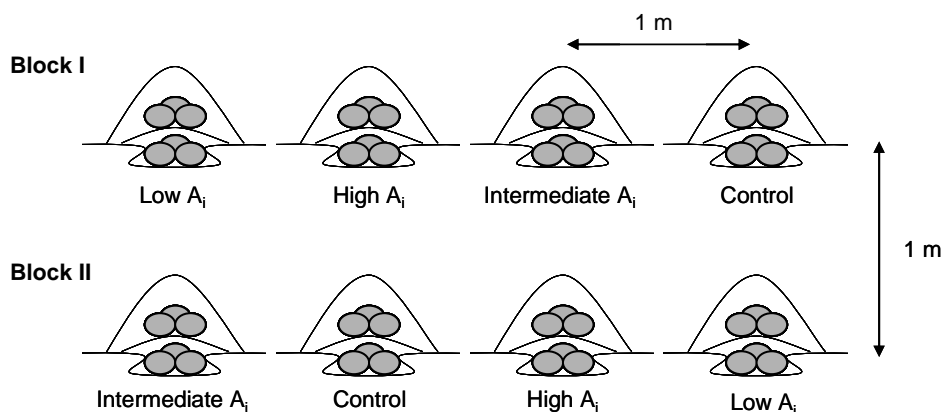
Nine *P. infestans* isolates were selected from the collection for this experiment. Three have a low  $A_i$  (isolates S1, S2 and S3; mean  $A_i = 12.72$ ), another three have an intermediate levels of  $A_i$  (isolates S4, S5 and S6; mean  $A_i = 13.73$ ), and the last three have a high  $A_i$  (isolates S7, S8 and S9; mean  $A_i = 14.27$ ). Aggressiveness differences between each of the groups are statistically significant ( $F_{2,51} = 73.71$ ,  $P < 0.0001$  in a one-way anova).

Each isolate was multiplied on leaflets of cv. Bintje, and sporangia were collected from the leaflets in sterile water as described above. Sporangial suspensions were adjusted to  $5 \times 10^2$  sporangia per mL using a haemocytometer. Before inoculation, sporangial suspensions were kept at 4°C for approximately 4 hours to promote zoospore liberation.

Undamaged tubers (cv. Bintje), between 35 and 45 mm in diameter, were surface-disinfected by dipping in 70% ethanol, allowed to air-dry and then placed in plastic boxes (45\*30\*7 mm) containing a filter paper saturated with 150 mL of sterile water, about 30 tubers per box, for two days to let lenticels open and favour infection. Tubers then received 30 mL of sprayed inoculum per box (*i.e.*, 1 mL by tuber). Inoculated tubers were incubated in the dark at 18°C for one week, firstly for three days with humidity and then four days without the filter paper. This inoculation method was mainly adapted from Bjor (1987) and Flier *et al.* (1998). A preliminary test on 20 tubers infected by each of two isolates confirmed that inoculation conditions achieved 100% infection.

The experiment was set up during the last week of October 2004 at Ploudaniel (48°50'N, 4°32'W), Le Rheu (48°11'N, 1°79'W) and Loos-en-Gohelle (50°45'N, 2°79'E). The three different locations were chosen to represent different winter conditions. Each winter was characterized by a daily recording of temperature, relative humidity and rainfall, collected at standard weather stations located a few metres to a few hundred metres from the trial sites. The experimental design at each location consisted of two blocks of four piles of tubers (Fig. 1). Each pile was composed of 6 potato bags, each containing 25 tubers inoculated with the same *P. infestans* isolate. In each block, one of the piles contained the bags inoculated with isolates S1, S2 and S3, the second pile contained the bags inoculated with isolates S4, S5 and S6, the third pile contained the bags inoculated with isolates S7, S8 and S9, and the fourth pile contained the control bags (tubers sprayed with water without

inoculum). For each isolate, one of the bags was placed in the bottom part of the pile and the other in the top part of the pile, to avoid differential mortality effects due to sheltering of the bottom bags by the top ones. The two parts of the pile were separated by 10-15 cm of soil and piles were covered with 10-15 cm of soil.



**Figure 4-1:** Experimental design for the survival experiment at three locations in France (Loos-en-Gohelle, Le Rheu and Ploudaniel). Tubers were either non-inoculated (control) or inoculated by *Phytophthora infestans* isolates with low (low  $A_i$ ), intermediate (intermediate  $A_i$ ) or high (high  $A_i$ ) aggressiveness indexes. Piles were covered with 10-15 cm of soil.

The presence of sprouts on each of the piles was monitored at regular intervals throughout the winter. Sprout numbers were scored on January 26th, 2005 for each pile at the three locations, and the aerial length of the 10 longest sprouts per pile was measured with a ruler. All bags were retrieved from the piles during the first week of April 2005, just before normal planting dates for potatoes in the three regions. Bags were opened and tubers were counted. Completely rotten tubers were recorded and discarded. The remaining tubers were placed in trays, and incubated in optimal conditions for sprouting in a polythene tunnel (ca. 18-20°C, limited daylight). The number of sprouting tubers was scored weekly for a month. Each sprouting tuber was cut to check for late blight symptoms, which confirmed that all were infected. The over-winter survival rate was expressed as the percentage of sprouted tubers per bag at the end of the experiment, since only germinating tubers are able to transmit the pathogen.

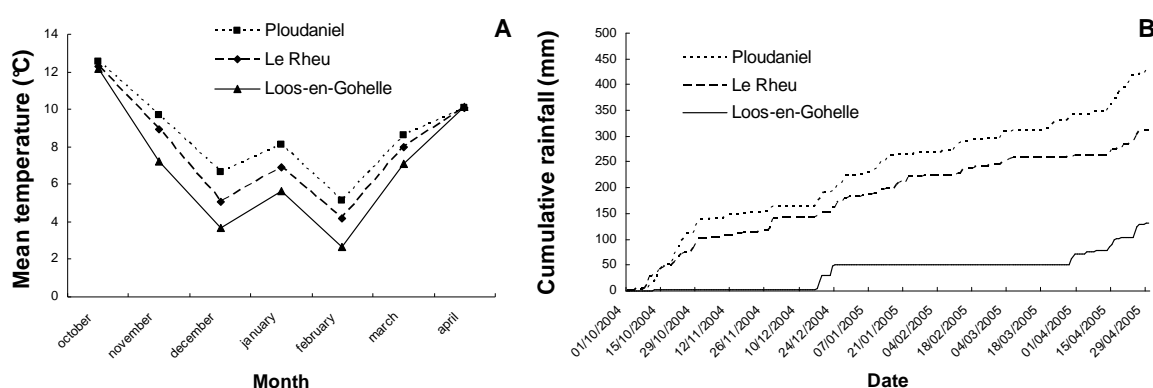
An arcsine transformation was used to normalize the distribution of residuals of over-winter survival rates. The effects of location, depth, pile, block (nested within location), and all two-way interactions on tuber survival distribution (transformed rates), were tested through an analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure in the statistical analysis

system software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A second ANOVA model was used to test the effects of pile, depth, block and interactions at each location. Numbers and lengths of sprouts were compared between piles for each location with a third anova model. When significant effects were detected, mean values were compared with the Student-Newman-Keuls test ( $\alpha = 0.05$ ).

## C. Results

### *C.1. Winter characteristics*

Monthly mean temperatures were 1-3°C lower in Loos-en-Gohelle than in the two sites in Brittany (Le Rheu and Ploudaniel) over the period October 2004 to April 2005 and temperatures were 0.5 to 1°C lower in Le Rheu than in Ploudaniel (Fig. 2a). As a consequence, the number of days with mean temperatures below 0°C was much higher in Loos-en-Gohelle (18 days over the period) than in either Le Rheu (6 days) or Ploudaniel (one day). These frosty days were also colder in Loos-en-Gohelle (lowest mean daily temperature - 3.4°C) than in Le Rheu (-2.6°C) or Ploudaniel (-0.4°C). Cumulative rainfall was much lower in Loos-en-Gohelle than in Le Rheu or Ploudaniel, which was the most humid place (Fig. 2b).

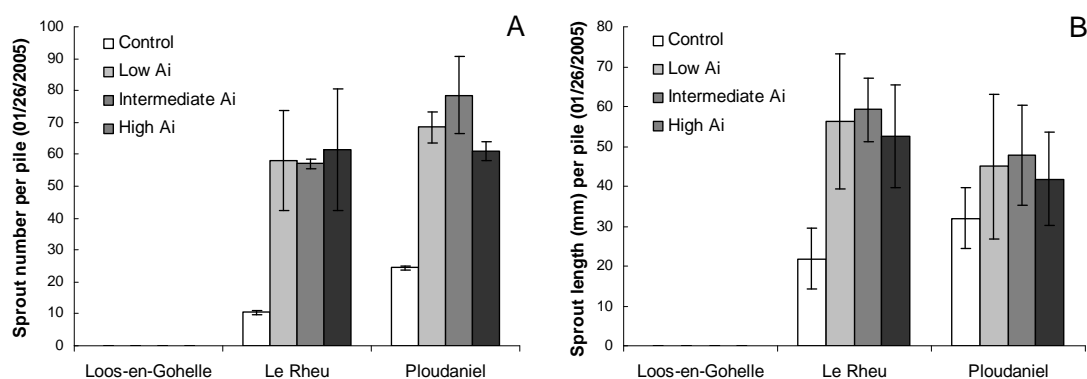


**Figure 4-2:** Climatic characterisation of the three experimental sites during the outdoor survival period. A: Monthly mean temperatures (°C) in Loos-en-Gohelle, Le Rheu and Ploudaniel from October 2004 to April 2005. B: Cumulative rainfall (mm) in the three locations over the experimental period.

### C.2. Sprouting during winter

Sprout emergence from the piles was observed at the end of January in Ploudaniel and in Le Rheu, but not in Loos-en-Gohelle. At both locations in Brittany, the number of sprouts was higher in inoculated piles than in control piles ( $F_{3,4} = 7.72$ ,  $P = 0.0386$  at Le Rheu, and  $F_{3,4} = 24.53$ ,  $P = 0.0049$  at Ploudaniel), but did not differ significantly according to the aggressiveness levels of isolates in inoculated piles (Fig. 3a). Sprout length was also higher in inoculated piles than in control piles ( $F_{3,76} = 41.78$ ,  $P < 0.0001$  at Le Rheu, and  $F_{3,76} = 5.51$ ,  $P = 0.0018$  at Ploudaniel), without significant differences between piles containing inoculated tubers (Fig. 3b).

In Le Rheu, the succession of five frosty days (Feb. 22, 23, 24 28, and March 1) with negative mean daily temperatures killed most of the sprouts whereas the only frosty day at Ploudaniel (Feb 28) did not.



**Figure 4-3:** Vegetative growth of surviving tubers during the winter at each of the three experimental sites. **A:** Sprout numbers (means  $\pm$  SE) counted on January 26, 2005 on piles of tubers non-inoculated (control) or inoculated with *Phytophthora infestans*. **B:** Sprout length (means  $\pm$  SE) measured on January 26, 2005 for the ten longest sprouts per pile.

### C.3. Tuber survival

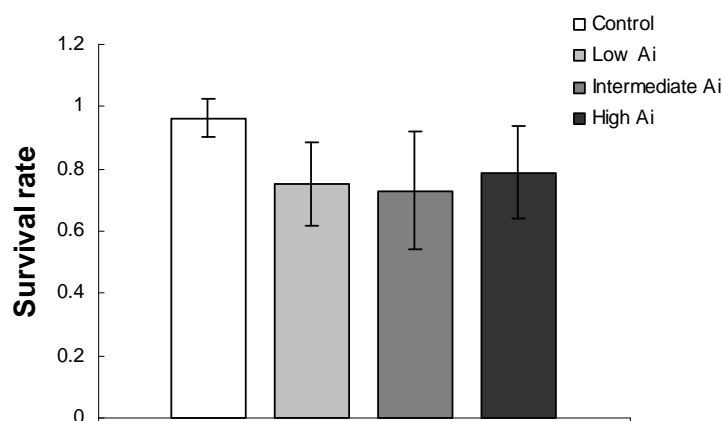
The anova showed significant effects of pile (*i.e.*, aggressiveness levels;  $F_{3,111} = 40.88$ ,  $P < 0.0001$ ) and of location ( $F_{2,111} = 3.96$ ,  $P = 0.0219$ ) on survival rates (Table 1). Comparison of means revealed that the survival of tubers from control piles was higher than the survival of tubers from inoculated piles, and that there was no significant difference in survival between piles containing tubers inoculated with isolates showing different

aggressiveness levels (Fig. 4). The interaction between pile and location ( $F_{6,111} = 0.94$ ,  $P = 0.4678$ ) was not significant, which points to the fact that survival patterns were consistent over all three locations. The rate of tuber survival was significantly higher at Ploudaniel (0.814) and Loos-en-Gohelle (0.842) than at Le Rheu (0.767).

A significant interaction was found between depths in the piles and locations ( $F_{2,111} = 5.49$ ,  $P = 0.0053$ ; table 1). The second ANOVA showed a significant effect of depth on survival at Le Rheu ( $F_{1,32} = 9.42$ ,  $P = 0.0044$ ), but not at Ploudaniel ( $F_{1,32} = 4.14$ ,  $P = 0.0502$ ) or Loos-en-Gohelle ( $F_{1,32} = 0.77$ ,  $P = 0.3879$ ). In Le Rheu, tubers from the bottom of the piles survived better than those from the top of the piles (0.818 vs. 0.717).

**Table 4-1:** Analysis of variance for tuber survival, using the GLM procedure in the SAS software. Sources of variation are location, depth, pile, block (nested within location) and all two-way interactions between these variables. The statistically significant effects are indicated by stars (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

| Source                | DF  | Mean Square | F value | Pr>F   |     |
|-----------------------|-----|-------------|---------|--------|-----|
| location              | 2   | 0.11906703  | 3.96    | 0.0219 | *   |
| depth                 | 1   | 0.02984022  | 0.99    | 0.3215 |     |
| pile                  | 3   | 1.22998606  | 40.88   | <.0001 | *** |
| block(location)       | 3   | 0.02403850  | 0.80    | 0.4970 |     |
| location*depth        | 2   | 0.16510564  | 5.49    | 0.0053 | **  |
| location*pile         | 6   | 0.02835200  | 0.94    | 0.4678 |     |
| depth*pile            | 3   | 0.03231877  | 1.07    | 0.3631 |     |
| pile*block(location)  | 9   | 0.03082569  | 1.02    | 0.4250 |     |
| depth*block(location) | 3   | 0.00397061  | 0.13    | 0.9409 |     |
| error                 | 111 | 0.03008459  |         |        |     |



**Figure 4-4:** Tuber survival rates (means  $\pm$  SE) in piles of tubers non-inoculated (control) or inoculated with *Phytophthora infestans* isolates with different aggressiveness indexes ( $A_i$ ).

## D. Discussion

Our general objective was to determine whether the most aggressive strains of *Phytophthora infestans* killed infected tubers during the winter period more than did weakly or moderately aggressive strains. Our data showed that over-winter survival of potato tubers inoculated with *P. infestans* is not correlated with the aggressiveness level of the pathogen strains. This finding was consistent over three sites with markedly different winter conditions. However an effect of parasite on sprouting was observed: inoculated tubers emit sprouts earlier than control tubers.

### D.1. Tuber survival and pathogen transmission

The lack of a significant effect of isolate aggressiveness on tuber survival strongly suggests the absence of a trade-off between aggressiveness and survival in *P. infestans*. However, this does not mean that there is no trade-off between aggressiveness and pathogen transmission to the next season. Although the mechanism for tuber infection from foliage-borne inoculum (passive carry-over by rain of infectious sporangia) does not suggest that this stage is likely to be subject to a trade-off, tuber infection is known to be modulated by cultivar resistance (Inglis *et al.* 1996) and inoculum abundance (Lapwood 1977) and, indeed, slow epidemics tend to increase tuber infection rates. One potential mechanism is that slow epidemics leave the plant with more functional foliage for a longer time, hence increasing the number and size of tubers (target sites for inoculum). Alternatively, they could maintain inoculum available for longer periods, increasing the probability that climatic conditions (rainy events) are favourable to tuber infection. It is thus possible that differences in aggressiveness, through inoculum production and/or the kinetics of disease progress on aerial organs, could result in differences in transmission rates. This should now be tested in specific experiments. Moreover, tuber survival is necessary, but not sufficient to ensure asexual transmission, as infected tubers can either decay in the soil, produce sprouts killed by the pathogen before they emerge, produce disease-free aerial shoots, or produce diseased aerial shoots (Robertson 1991). The first three situations would lead to an absence of airborne, viable inoculum for the next epidemic season in the spring, while only the last would result in successful transmission of the pathogen from one season to the next. Van der Zaag (1956) showed that the proportion of infected tubers giving rise to diseased shoots is generally low

(less than 10%) and varies according to season and host cultivar. Our data provide evidence that aggressiveness does not impact the proportion of infected tubers in the first two categories. However, they do not allow distinction between tubers producing diseased or disease-free aerial stems. It is possible that aggressive strains will reduce the number of diseased shoots by killing sprouts early, even if they do not exhaust the nutritive basis provided by the tuber itself. A trade-off between aggressiveness and transmission would therefore occur during the step involving transfer from foliage to tubers or during emission of diseased shoots, but not between aggressiveness and survival.

#### D.2. Direct and indirect effects of infection on tuber survival

We showed that tuber infection decreases survival in two different ways. First, a proportion of tubers rot in the soil, or fail to produce viable sprouts; second, infected tubers tended to emit sprouts earlier than control tubers in the two locations with high rainfall and mild temperatures (Le Rheu and Ploudaniel). At one of these locations (Le Rheu), the sprouts that formed in January were destroyed by frost at the end of February, although January sprouts persisted at Ploudaniel where temperatures never dropped below zero for more than a few hours. At Le Rheu, tubers with frozen sprouts were not subsequently able to generate shoots, resulting in a lower proportion of surviving tubers in April than at the other two sites; the loss affected only the tubers from the top of the piles, which explains the significant depth \* location interaction observed at this site.

The induction of early sprouting in infected tubers can be interpreted as either a manipulation of the host by the pathogen in order to reduce the length of time between two consecutive epidemics, or as a host response to pathogen infection by accelerating its vegetative growth so as to reduce the impact of the pathogen on its survival and reproductive success (Hochberg, Michalakis & de Meeus 1992; Sorensen & Minchella 1998; Agnew *et al.* 1999; Fredensborg & Poulin 2006), or as a response of tubers in decaying piles to modification of the microclimate of these piles. The third explanation is least likely, because sprouting was observed at only two of the three sites, although rotting occurred at all three sites. It is difficult to know which of the other two hypotheses is correct, since there is no information that we are aware of regarding alteration of potato growth by molecules emitted by *P. infestans*. Manipulation of the host life cycle by the pathogen, a sign of a long standing co-evolution towards biotrophy and specialization (Coffey & Gees 1991), certainly can impact transmission (Shykoff & Kaltz 1998; Thomas, Adamo & Moore 2005), as can an



alteration of the host growth cycle. In the case of *P. infestans*, in regions with mild, wet winters, either mechanism will result in a reduction of the dependence on tuber tissue (a limiting resource) for the pathogen; however, pathogen transmission (and host reproductive success) will be reduced if sprout production early in the winter is destroyed by later, occasional frosty periods, as was the case at Le Rheu. The induction of early sprouting will thus favour both the host and pathogen only when no frosty periods destroy early sprouts, as was the case in Ploudaniel.

### D.3. Consequences of survival for aggressiveness evolution

Our data suggest that there is no trade-off between aggressiveness and survival in infected tubers in asexual populations of *P. infestans*. This virtually equates with a lack of trade-off between aggressiveness and over-winter survival overall, as saprotrophic survival in soil of *P. infestans* does not extend beyond a few days or weeks (Andrivon, 1995), *i.e.* a duration much shorter than the interval between two consecutive potato crops. The absence of such a trade-off makes selection during epidemic phases more important. Andrivon *et al.* (2007) showed that sporulation capacity tended to increase between early and late samples from the same non-sprayed crop, suggesting that directional selection for increased aggressiveness takes place during the epidemic stage. Pathogenicity can evolve rapidly even in genetically homogeneous groups of isolates (Goodwin, Sujkowski & Fry 1995); the strong dependence of the pathogen on its host probably magnifies these selective effects (Montarry *et al.* 2006). If aggressiveness increases between the start and the end of epidemics and there is no selection against the most aggressive isolates during the survival phase of the life cycle, mean aggressiveness levels should increase gradually over time in *P. infestans* populations. This prediction is in line with the gradual increase in aggressiveness suggested or reported in recent populations of *P. infestans* in Europe (Day & Shattock 1997) and in the USA (Fry *et al.* 1992; Kato *et al.* 1997), although it has been regarded primarily as a consequence of population replacement by newly imported, highly aggressive genotypes. The lack of a trade-off between aggressiveness and over-winter survival, observed in our experiments, might provide an explanation for such pathogenicity shifts over time.

## E. Acknowledgements

We thank R. Pellé and D. Ellissèche (INRA, UMR APBV, Ploudaniel) and L. Dubois and S. Duvauchelle (SRPV Nord Pas de Calais, Loos-en-Gohelle) for hosting the experimental plots. The help of H. Douchy for the inoculations and scoring is gratefully acknowledged. We are also very grateful to Y. Michalakakis, O. Kaltz and O. Plantard for very valuable comments on a draft version of this paper. J. Montarry is supported by a PhD grant from Bretagne-Plants, acting on behalf of the ACVNPT (Association des Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre).

## F. References

- Agnew, P., Bedhomme, S., Haussy, C. & Michalakakis, Y. (1999) Age and size at maturity of the mosquito *Culex pipiens* infected by the microsporidian parasite *Vavraia culicis*. *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**, 947-952.
- Anderson, R.M. & May, R.M. (1982) Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* **85**, 411-426.
- Andrison, D. (1995) Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* **85**, 1053-1056.
- Andrison, D. (1996) The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology* **45**, 1028-1036.
- Andrison, D., Corbière, R., Lucas, J.M., Pasco, C., Gravouelle, J.M., Pellé, R., Dantec, J.P. & Ellissèche, D. (2003) Resistance to late blight and soft rot in six potato progenies and glycoalkaloid contents in the tubers. *American Journal of Potato Research* **80**, 125-134.
- Andrison, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E.H., Pellé, R. & Ellissèche, D. (2007) Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology*, in press.
- Bjor, T. (1987) Testing the resistance of potato genotypes to tuber blight. *Potato Research* **30**, 525-532.

- Brasier, C.M. (1987) The dynamics of fungal speciation. *Evolutionary biology of the fungi* (eds A.D.M. Rayner, C.M. Brasier & D. Moore), pp. 231-260. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Bruehl, G.W. (1987) *Soilborne plant pathogens*. Macmillan, New York.
- Coffey, M.D. & Gees, R. (1991) The cytology of development. *Advances in Plant Pathology vol. 7 - Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato* (eds D.S. Ingram & P.H. Williams), pp. 31-51. Academic Press, London.
- Crute, I.R., Norwood, J.M. & Gordon, P.L. (1987) The occurrence, characteristics and distribution in the United Kingdom of resistance to phenylamide fungicides in *Bremia lactucae* (lettuce downy mildew). *Plant Pathology* **36**, 297-315.
- Day, J.P. & Shattock, R.C. (1997) Aggressiveness and other factors relating to displacement of population of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 379-391.
- Drenth, A., Janssen, E.M. & Govers, F. (1995) Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **44**, 86-94.
- Ewald, P.W. (1983) Host-parasite relations, vectors and the evolution of disease severity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **14**, 465-485.
- Flier, W.G. & Turkensteen, L.J. (1999) Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 381-388.
- Flier, W.G., Turkensteen, L.J. & Mulder, A. (1998) Variation in tuber pathogenicity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Potato Research* **41**, 345-354.
- Flier, W.G., van den Bosch, G.B.M. & Turkensteen, L.J. (2003) Stability of partial resistance in potato cultivars exposed to aggressive strains of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **52**, 326-337.
- Frank, S.A. (1996) Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology* **71**, 37-78.
- Fredensborg, B.L. & Poulin, R. (2006) Parasitism shaping host life-history evolution: adaptive responses in a marine gastropod to infection by trematodes. *Journal of Animal Ecology* **75**, 44-53.
- Fry, W.E., Goodwin, S.B., Dyer, A.T., Matuszak, J.M., Drenth, A., Tooley, P.W., Sujkowski, L.S., Koh, Y.J., Cohen, B.A., Spielman, L.J., Deahl, K.L., Inglis, D.A. & Sandlan, K.P. (1993) Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* **77**, 653-661.

- Fry, W.E., Goodwin, S.B., Matuszak, J.M., Spielman, L.J., Milgroom, M.G. & Drenth, A. (1992) Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 107-130.
- Goodwin, S.B. (1997) The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* **87**, 462-473.
- Goodwin, S.B., Sujkowski, L.S. & Fry, W.E. (1995) Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology* **85**, 669-676.
- Hammond-Kosack, K.E. & Parker, J.E. (2003) Deciphering plant-pathogen communication; fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 177-183.
- Harrison, J.G. (1992) Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage – a review. *Plant Pathology* **41**, 384-416.
- Hochberg, M.E., Michalakakis, Y. & de Meeus, T. (1992) Parasitism as a constraint on the rate of life-history evolution. *Journal of Evolutionary Biology* **5**, 491-504.
- Hohl, J. & Iselin, K. (1984) Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. *Transactions of the British Mycological Society* **83**, 529-530.
- Inglis, D.A., Johnson, D.A., Legard, D.E., Fry, W.E. & Hamm, P.B. (1996) Relative resistances of potato clones in response to new and old populations of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* **80**, 575-578.
- Isaac, S. (1992) *Fungal-plant interactions*. Chapman and Hall, London.
- Kato, M., Mizubuti, E.S., Goodwin, S.B. & Fry, W.E. (1997) Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* **87**, 973-978.
- Koella, J.C. & Agnew, P. (1999). A correlated response of a parasite's virulence and life cycle to selection on its host's life history. *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 70-79.
- Lapwood, D.H. (1977) Factors affecting the field infection of potato tubers of different cultivars by blight (*Phytophthora infestans*). *Annals of Applied Biology* **85**, 23-45.
- Lebreton, L., Laurent, C. & Andrivon, D. (1998) Evolution of *Phytophthora infestans* populations in the two most important potato production areas in France during 1992-1996. *Plant Pathology* **47**, 427-439.
- Mc Donald, B.A. & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349-379.
- Montarry, J., Corbière, R., Lesueur, S., Glais, I. & Andrivon, D. (2006) Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 522-531.

- Niederhauser, J.S. (1991) *Phytophthora infestans*: the Mexican connection. *Phytophthora* (eds J.A. Lucas, R.C. Shattock, D.S. Shaw & L.R Cooke), pp. 25-45. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Paul, R.E.L., Lafond, T., Müller-Graf, C.D.M., Nithiuthai, S., Brey, P.T. & Koella, J.C. (2004) Experimental evaluation of the relationship between lethal or non-lethal virulence and transmission success in malaria parasite infections. *BMC Evolutionary Biology* **4**, 30.
- Porter, L.D., Dasgupta, N. & Johnson, D.A. (2005) Effects of tuber depth and soil moisture on infection of potato tubers in soil by *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* **89**, 146-152.
- Poulin, R. & Combes, C. (1999) The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitology Today* **15**, 474-475.
- Robertson, N.F. (1991) The challenge of *Phytophthora infestans*. *Advances in Plant Pathology vol. 7 - Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato* (eds D.S. Ingram & P.H. Williams), pp. 1-30. Academic Press, London.
- Shykoff, J.A. & Kaltz, O. (1998) Phenotypic changes in host plants diseased by *Microbotryum violaceum*: parasite manipulation, side effects, and trade-offs. *International Journal of Plant Sciences* **159**, 236-243.
- Sorensen, R.E. & Minchella, D.J. (1998) Parasite influences on host life history: *Echinostoma revolutum* parasitism of *Lymnaea elodes* snails. *Oecologia* **115**, 188-195.
- Thakur, R.P. & Shelly, K.G. (1993) Variation in pathogenicity among single-oospore isolates of *Sclerospora graminicola*, the causal organism of downy mildew in pearl millet. *Plant Pathology* **42**, 715-721.
- Thomas, F., Adamo, S. & Moore, J. (2005) Parasite manipulation: where are we and where should we go? *Behavioural Processes* **68**, 185-199.
- Thrall, P.H., Bever, J.D., Mihail, J.D. & Alexander, H.M. (1997) The population dynamics of annual plants and soil-borne fungal pathogens. *Journal of Ecology* **85**, 313-328.
- Van der Zaag, D.E. (1956) Overwintering en epidemiologie van *Phytophthora infestans*, tevens enige nieuwe bestrijdingsmogelijkheden. *Tijdschrift over Plantenziekten* **62**, 89-156.
- Vanderplank, J.E. (1963). *Plant diseases – epidemics and control*. Academic Press, New York.

Wastie, R.L. (1991). Breeding for resistance. *Advances in Plant Pathology* vol. 7 - *Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato* (eds D.S. Ingram & P.H. Williams), pp. 193-224. Academic Press, London.



## ***Chapitre 5***

### ***Discussion générale***



## DISCUSSION GENERALE

L'objectif général de cette thèse était de décrire et de comprendre la capacité d'adaptation des populations de *Phytophthora infestans* aux résistances des variétés de pomme de terre déployées en culture, pour décrire – et, si possible, prévoir- leur durabilité.

L'analyse de la réponse adaptative des populations de *P. infestans* au déploiement de différentes variétés a été réalisée à deux échelles spatiales : celle de micro-parcelles expérimentales et celle des principaux bassins de production de pomme de terre français, via deux approches complémentaires : le test de l'adaptation locale et l'analyse de la structuration neutre.

Outre des informations sur les processus sélectifs, cette thèse a apporté des informations sur l'intervention de phénomènes autres que la sélection dans l'évolution des populations pathogènes, tel que les flux de gènes ou la dérive génétique. Elle a également soulevé le possible rôle à l'avenir de la recombinaison sexuée.

L'hypothèse d'un trade-off entre agressivité et capacité de survie pendant l'hiver a également été testée, afin de pouvoir prendre en compte le caractère polyétique de cette maladie.

Après un rappel des principaux résultats obtenus et leur discussion, nous exposerons les orientations de recherches qui pourraient être développées à la suite de ce travail, pour chacun des trois points énumérés ci-dessus et par rapport à l'objectif de gestion durable des résistances.

## A. Structuration par l'hôte des populations pathogènes

### A.1. Structuration des populations pathogènes pour la virulence

Comme attendu, une variété avec une résistance majeure structure la population pathogène pour la virulence : seuls les isolats virulents face à R2 sont capables d'attaquer Naturella (variété possédant R2). Ces isolats ne sont d'ailleurs pas retrouvés sur les variétés dépourvues de gène majeur de résistance, Bintje et Désirée. Ceci peut être dû à un coût de virulence, ou simplement à une asynchronie dans le développement de l'épidémie entre les variétés pourvues et dépourvues du gène majeur de résistance (les résistances totales provoquant un retard dans le démarrage de l'épidémie – Vanderplank 1963). La seconde hypothèse est ici plus probable, car il ne semble pas y avoir de coût de virulence lors du passage de l'avirulence à la virulence face à R2 (Pilet *et al.*, 2005). De plus, Schöber & Turkensteen (1992) ont postulé l'absence de coût de virulence chez *P. infestans*, à partir de résultats montrant une absence de corrélation entre la fitness et la complexité des profils de virulence dans des populations européennes. Ce postulat est renforcé par le maintien de virulences non nécessaires dans les populations européennes, comme la virulence face à R7 qui est largement présente dans les populations pathogènes, alors que ce gène n'a jamais été utilisé dans les variétés hôtes cultivées en Europe. Une telle virulence peut donc être considérée comme une « virulence fossile », qui aurait été sélectionnée au Mexique avant la migration vers l'Europe (Andrison *et al.*, 2004). L'accumulation de « virulences fossiles » a également été proposée chez les rouilles des céréales (Andrison & de Vallavieille Pope, 1995). Toutefois, les gènes d'avirulence ayant des fonctions variées (White *et al.*, 2000 ; Luderer & Joosten, 2001), nous pouvons envisager qu'il y ait des coûts de virulence pour certains gènes et pas pour d'autres. Ceci a été montré par exemple chez la bactérie pathogène du riz *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Vera Cruz *et al.*, 2000).

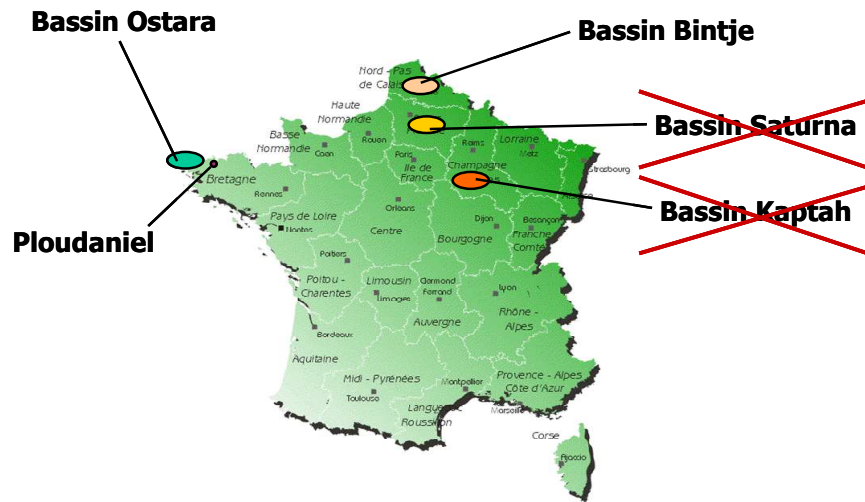
La mesure des coûts de virulence associés à chacun des gènes majeurs de résistance peut être faite par une mesure indirecte sur bulks quasi-isogéniques, c'est-à-dire en comparant l'agressivité de souches génotypiquement identiques et différentes par leur virulence. Nous disposons maintenant de deux lots de souches de *P. infestans* présentant les mêmes empreintes AFLP (environ 40 et 50 souches appartenant aux groupes AFLP 3 et 4, respectivement - cf. chapitre 2), ainsi que d'environ 160 souches génotypiquement identiques

pour les 10 locus microsatellites testés. Ces souches présentent des profils de virulence différents et leur agressivité sur des variétés dépourvues de gène majeur de résistance a été déterminée. L'analyse de ces données est une perspective à court terme qui permettra de confirmer ou d'infirmer l'absence de coût de virulence chez *P. infestans*.

#### A.2. Structuration des populations pathogènes pour l'agressivité

Tant à l'échelle locale qu'à l'échelle régionale, nos données sur les variétés Bintje, Ostara et Désirée, dépourvues de résistance totale, montrent une variation importante pour l'agressivité dans les populations de *P. infestans*. Ceci suggère qu'une adaptation des populations pathogènes pour l'agressivité, amenant éventuellement à l'érosion des résistances partielles (Mc Donald & Linde, 2002), est possible.

Tester l'hypothèse d'adaptation locale à l'échelle des principaux bassins de production français, qui sont dominés par des variétés adaptées à leur type de marché propre, avait été prévue sur quatre bassins de production, chacun dominé par une variété de pomme de terre, en utilisant comme témoin un site ne présentant pas de variété dominante (Fig. 5-1). L'objectif étant la recherche de patrons d'adaptation locale, l'échantillonnage devait être réalisé sur les populations naturelles de *P. infestans*. Malheureusement, les parcelles des variétés partiellement résistantes Saturna en Picardie et Kaptah-Vandel en Champagne n'ont pas été attaquées par le mildiou, ni en 2004, ni en 2005, ce qui nous a amené à restreindre l'étude à trois sites au lieu de cinq.



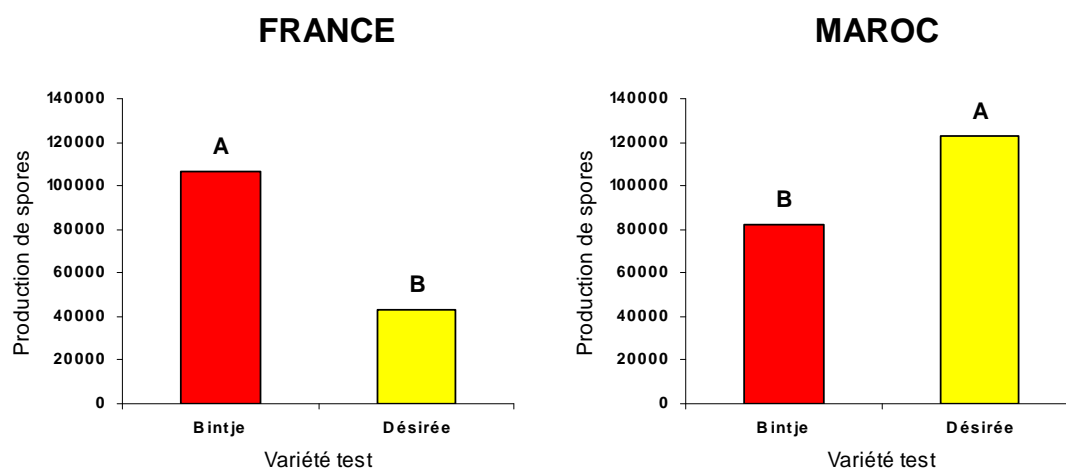
**Figure 5-1 :** Bassins de production choisis pour tester l'hypothèse d'adaptation locale des populations de *Phytophthora infestans*. La pointe du Finistère est dominée par la variété sensible Ostara, la région Nord-Pas-de-Calais est dominée par la variété sensible Bintje, la région Picardie est dominée par la variété partiellement résistante Saturna, la région Champagne est dominée par la variété partiellement résistante Kaptah-Vandel et le site de Ploudaniel est dépourvu de variété dominante. Aucun échantillonnage n'a pu être réalisé dans les bassins Saturna et Kaptah.

#### *a. Adaptation et échelles spatiales*

L'absence d'interaction différentielle entre les populations hôtes et pathogènes montre qu'il n'y a pas d'adaptation (ou de maladaptation) locale à l'échelle régionale. Le patron adaptatif émergent de nos données est une adaptation générale des populations pathogènes à l'hôte dominant en France (Bintje), correspondant à un seul phénotype spécialiste bien adapté à une variété et moins adapté aux autres. Effectivement, i) les populations pathogènes issues des trois sites sont plus agressives sur Bintje que sur Ostara, et ii) sur Bintje, la population pathogène résidente est plus agressive que les populations non-résidentes, alors que sur Ostara les populations pathogènes non-résidentes sont plus agressives que la population résidente.

Il est possible que les différentes populations pathogènes soient à des stades différents d'adaptation locale. Ainsi, l'absence de patron ne signifie pas nécessairement que le processus de sélection divergente n'opère pas (Kawecki & Ebert, 2004). L'association hôte-pathogène étudiée ici confirme les hypothèses postulant qu'un taux de dispersion important (Kaltz & Shykoff, 1998) et une dérive génétique forte, correspondant à une survie limitée pendant la saison de 'creux démographique' (Thrall & Burdon, 1997 ; Burdon & Thrall, 2000), peuvent amener à un patron d'adaptation locale détectable seulement à une échelle spatiale large. Effectivement, l'adaptation locale n'a été détectée ni à l'échelle spatiale limitée de micro-parcelles expérimentales (chapitre 2 à Ploudaniel entre Bintje et Désirée ; chapitre 3 dans le

nord de la France et en Bretagne entre les variétés Bintje et Ostara), ni à l'échelle des principaux bassins de production français (chapitre 3). Elle a par contre été observée à une échelle spatiale plus large : en effet, les isolats marocains sont plus agressifs sur Désirée, qui est la variété dominante dans ce pays, que sur Bintje, qui est dominante en France, alors que les isolats français sont plus agressifs sur Bintje que sur Désirée (Fig. 5-2 d'après Andrivon *et al.*, 2007 [ANNEXE I]). Le processus d'adaptation locale à la variété dominante semble donc opérer dans le pathosystème *Phytophthora infestans* / *Solanum tuberosum*, mais il n'est détectable qu'à une échelle spatiale large.



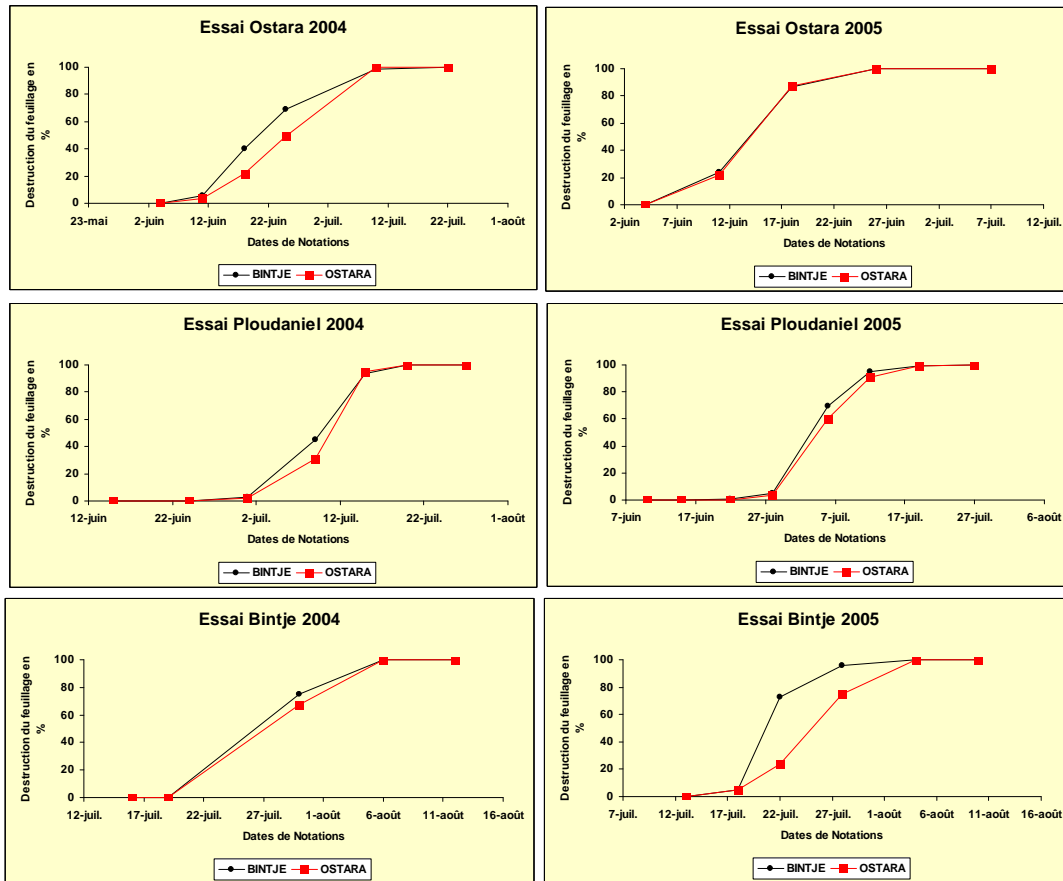
**Figure 5-2 :** Nombre de spores produites par foliole sur les variétés Bintje et Désirée, par des isolats de *P. infestans* collectés en France et au Maroc. A et B représentent les groupes homogènes identifiés (test SNK,  $P=0,05$ ). D'après Andrivon *et al.*, (2007).

L'adaptation locale est donc détectable lorsque les populations de *P. infestans* sont très distantes géographiquement (entre la France et le Maroc). Se pose maintenant la question de savoir si une échelle spatiale large est indispensable pour obtenir une adaptation différentielle, ou si une barrière géographique de quelques kilomètres peut isoler suffisamment les populations. Il s'agit alors de savoir si l'adaptation locale augmente avec la distance géographique ou avec l'isolement génétique des populations. Pour cela, nous avons entrepris en 2006 un échantillonnage incluant des îles (Jersey et Noirmoutier) et les zones de production continentales les plus proches. La culture de pomme de terre sur l'île de Jersey se limite à une seule variété, Jersey-Royal, cultivée de manière exclusive depuis environ 120 ans. L'île de Noirmoutier est dominée par la variété Sirtéma, qui n'est pas la seule variété à être cultivée sur l'île. L'analyse de ces populations à la fois pour leur agressivité et pour leur structure génétique permettra de déterminer s'il y a un isolement entre les populations de *P.*

*infestans* des îles et du continent et si l'adaptation locale est détectable à cette échelle spatiale plus restreinte que celle explorée par Andrivon *et al.* (2007), lorsqu'une barrière naturelle sépare les populations.

*b. Adaptation et caractéristiques de l'hôte*

Nous avons montré, dans le second chapitre, que les souches originaires de la variété sensible Bintje sont plus agressives que celles originaires de Désirée, et ce sans adaptation différentielle entre les variétés. Cependant, ces données ne nous permettaient pas de trancher entre une adaptation à la sensibilité, ou à la dominance de la variété. Dans le troisième chapitre, nous avons montré qu'il s'agit d'une adaptation à la dominance de la variété plutôt qu'à son niveau de résistance. Effectivement, les populations sont adaptées à Bintje et pas à Ostara, alors qu'il s'agit de deux variétés sensibles au mildiou de la pomme de terre. Elles ont toutes deux la note de 3 (sur une échelle allant jusqu'à 9) pour le mildiou du feuillage, dans les tests officiels d'attribution du niveau de résistance (Catalogue français des variétés de pomme de terre, 2001), et elles se comportent effectivement de façon similaire dans les essais que nous avons mis en place dans les différents sites d'expérimentation (Fig. 5-3). Cette observation confirme que la performance des parasites ne covarie pas nécessairement avec le degré de dommage à l'hôte (Kaltz & Shykoff, 1998 ; Kirchner & Roy, 2002 ; Dybdahl & Storfer, 2003). De plus, le patron d'adaptation générale est conforté par les comparaisons entre populations résidentes et non-résidentes sur chacun des génotypes hôtes, et ces comparaisons « local vs. foreign » ne sont pas sensibles aux différences du niveau de résistance (ou de sensibilité) des hôtes (Thrall *et al.*, 2002). Enfin, l'adaptation différentielle entre Bintje et Désirée, observée entre les populations pathogènes françaises et marocaines (Andrivon *et al.*, 2007 [ANNEXE I]), montre bien que le niveau de résistance n'est que secondaire, par rapport à la dominance de la variété, pour l'adaptation des populations de *P. infestans*.



**Figure 5-3 : Courbes de progression de maladie sur les variétés Bintje et Ostara dans les essais placés dans le bassin de production dominé par la variété Ostara à Ploudaniel et dans le bassin dominé par la variété Bintje.**

*c. Adaptation : caractéristiques individuelles ou populationnelles ?*

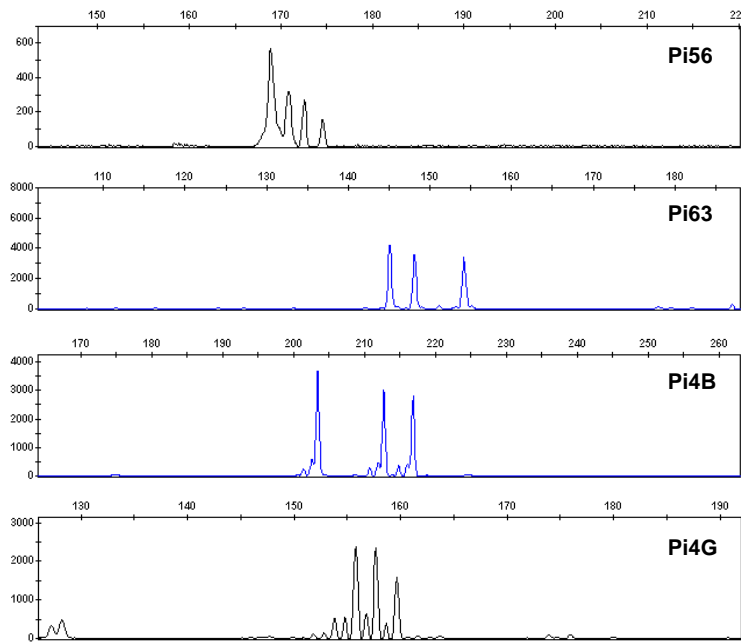
Nos résultats montrent que les populations pathogènes sont capables de s'adapter aux variétés hôtes, mais ne nous permettent pas de déterminer le niveau d'organisation impliqué dans cette adaptation. Il est en effet maintenant nécessaire de dissocier les forces évolutives agissant au niveau de la population de celles agissant au niveau de l'individu lors de l'adaptation de *P. infestans* aux variétés de pomme de terre. De nombreuses expérimentations de passages successifs avec des parasites transmis horizontalement montrent une augmentation rapide des taux de croissance du parasite (Ebert, 1998). Jinks & Grindle (1963) ont mis en évidence une augmentation d'agressivité lors de passages successifs de souches de *P. infestans* qui avaient été conservées entre un et trois ans sur milieu de culture. Ces auteurs montrent également que le gain d'agressivité observée compense uniquement la perte antérieure lors de la conservation, et en concluent que les modifications phénotypiques au niveau des individus est secondaire, par rapport à la sélection, dans les variations de pouvoir

pathogène chez *P. infestans*. La réalisation en conditions contrôlées d'une succession de cycles sur une variété différente de la variété d'origine des souches (évolution expérimentale), et la quantification de l'agressivité sur les variétés sympatriques et allopatriques tous les 3-5 cycles peut être envisagée pour déterminer si le résultat obtenu par Jinks et Grindle sur des populations de *P. infestans* prélevées en 1958 et 1960, depuis remplacées par de nouvelles populations (Spielman *et al.*, 1991), est transférable sur ces nouvelles populations. Ce type d'expérience permettra également d'estimer le nombre de cycles nécessaire pour que les individus pathogènes s'adaptent à une variété allopatrique par plasticité phénotypique. De telles expérimentations d'évolution expérimentale pourront enfin permettre de quantifier le coût de l'adaptation, s'il existe, entre différentes variétés de pommes de terre (présentant différents niveaux de résistances), ce qui apportera des informations essentielles pour la gestion durable des résistances variétales face au mildiou de la pomme de terre.

### A.3. Structuration génotypique des populations pathogènes

L'analyse classique de données microsatellites utilise les fréquences alléliques à chaque locus. La présence dans notre jeu de données d'individus présentant à certains loci plus de deux allèles (Fig. 5-4), confirme les observations, réalisées par cytométrie de flux, montrant que les populations européennes de *P. infestans* contiennent des individus diploïdes, mais aussi des individus polyploïdes ou aneuploïdes (Tooley & Therrien, 1987), et celles plus récentes mettant en évidence de la trisomie à certains loci uniquement (Carter *et al.*, 1999 ; Van der Lee *et al.*, 2004). Il en résulte que les fréquences alléliques ne sont pas correctement estimables, ce qui interdit une analyse classique basée sur ces fréquences (calcul de  $F_{st}$ ...). Nous pouvons toutefois travailler sur les fréquences génotypiques, en définissant le génotype par la présence ou l'absence de chaque allèle à chaque locus. La matrice binaire obtenue permet le calcul de distances génotypiques entre les individus et la construction de dendrogrammes.





**Figure 5-4 :** Exemples de locus microsatellites présentant plus de deux allèles (quatre pour Pi56 et trois pour Pi63, Pi4B et Pi4G). Chaque profil correspond ici à un individu différent.

La faible diversité génotypique (90% de similarité génotypique) mise en évidence par AFLP dans les populations provenant de micro-parcelles expérimentales contiguës suggère que la population locale de Ploudaniel est constituée de quelques lignées clonales proches, dérivant certainement l'une de l'autre par mutation. Ceci est cohérent avec le fait qu'il n'y ait pas de reproduction sexuée en Bretagne.

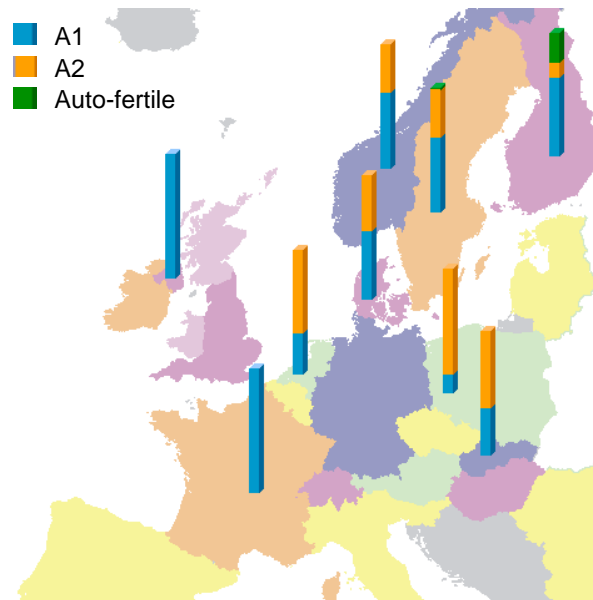
Les deux populations voisines géographiquement, provenant de Bretagne, sont plus proches génotypiquement que celle provenant du nord de la France. La localisation de ces deux régions de France peut constituer un élément d'explication à cette différence de diversité génotypique, la Bretagne étant très isolée en comparaison du Nord-Pas-de-Calais, proche des zones de production belges et hollandaises. Le fait que la diversité génotypique soit plus importante dans le nord de la France peut également avoir un lien avec l'augmentation en fréquence des souches du type sexuel A2 dans cette région (*cf.* paragraphe B de cette discussion générale). Effectivement, l'observation d'une diversité génotypique importante est généralement considérée comme un indice de présence de recombinaison (Mc Donald, 1997).

L'absence de structuration génotypique claire de la population française de *P. infestans* indique certainement d'importants flux de gène dus à la migration de l'agent pathogène à l'échelle spatiale étudiée. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus par Lebreton *et al.* (1998), qui montraient également, via les allozymes *Gpi* et *Pep*, que les

populations françaises de *P. infestans* ne sont pas structurées géographiquement. Le patron d'adaptation générale observé serait donc en partie la conséquence d'importants flux de gènes entre les populations pathogènes des différentes régions, mais nos résultats ne nous permettent pas de conclure par rapport au sens des migrations. D'une part, les vents dominants, susceptibles de transporter les sporanges sur de longues distances, sont majoritairement d'ouest en est. D'autre part, la diffusion des individus des habitats favorables (bassin dominé par Bintje) aux habitats moins favorables est normalement plus fréquente que l'inverse, car les effectifs des populations des habitats favorables sont plus importants (Hastings, 1983).

## B. Agressivité et mode de reproduction des populations pathogènes

*Phytophthora infestans* se multiplie par voie asexuée (spores et zoospores), mais peut également former des organes sexuels (oospores) si les deux types sexuels complémentaires (A1 et A2) sont en présence. Jusqu'au début des années 1980, les populations européennes de *P. infestans* ne renfermaient que des souches appartenant au type sexuel A1, le type sexuel A2 n'étant présent qu'au Mexique, centre d'origine vraisemblable de la maladie (Niederhauser, 1991 ; Andrivon, 1996). Aujourd'hui, il y a environ 50% de souches A1 et 50% de souches A2 dans la plupart des pays du nord-est de l'Europe (Hannukkala *et al.*, 2005). Ceci est illustré par la figure 5-5.



**Figure 5-5 :** Proportion par pays de souches A1, de souches A2 et de souches auto-fertiles<sup>a</sup> en Europe pour l'année 2003. Les effectifs utilisés sont n=20 pour le Danemark, n=218 pour la Finlande, n=7 pour la France, n=40 pour l'Irlande du Nord, n=24 pour les Pays-Bas, n=328 pour la Norvège, n=20 pour la Pologne, n=88 pour la Suède et n=26 pour la Slovaquie. D'après <http://www.eucablight.org>.

<sup>a</sup> : Souche capable de produire des oospores en l'absence du type sexuel opposé.

Jusqu'à récemment, la reproduction sexuée ne survenait pas dans les populations françaises, qui ne comportaient que le type sexuel A1 (Andrivon *et al.*, 1994 ; Lebreton *et al.*, 1998). Toutefois, depuis 2003, la fréquence des souches de type A2 augmente très fortement dans le nord de la France : 7% en 2003, 20% en 2004, 37% en 2005 (Dubois et Duvauchelle, 2005), et environ 70% en 2006 (L. Dubois et D. Détourné, communication personnelle).

L'augmentation en fréquence des souches de type sexuel A2 confère donc aux populations du nord de la France une capacité accrue à produire des oospores. La question de l'invasion et de la persistance des souches de type sexuel A2 doit maintenant être posée. Une hypothèse possible était que les souches A2 possèdent un pouvoir pathogène plus élevé que les souches A1, présentes de longue date sur le territoire. Toutefois, la comparaison de l'agressivité de souches françaises appartenant à chacun des deux types sexuels montre que les souches A1 sont plus agressives que les souches A2 (ce résultat a fait l'objet d'une publication dans *Phytoma – La Défense des Végétaux* [ANNEXE II]). La présence conjointe des deux types sexuels ne paraît donc pas devoir entraîner à court terme une augmentation rapide du pouvoir pathogène des populations françaises. Elle peut cependant avoir des conséquences sur la nature des sources d'inoculum et, à terme, sur les capacités évolutives des populations de *P. infestans*. D'une part, qui dit reproduction sexuée de *P. infestans* dit formation d'oospores, capables de survivre plusieurs hivers dans le sol et de germer au retour de la culture de pomme de terre dans la parcelle (Drenth *et al.*, 1995 ; Medina & Platt, 1999 ; Hammi *et al.*, 2001). Ces oospores constituent alors une source d'inoculum primaire nouvelle, susceptible d'entraîner une plus grande précocité des épidémies (Anderson *et al.*, 1998 ; Lehtinen & Hannukkala, 2004). D'autre part, si la reproduction sexuée remplace (ou s'ajoute à) la reproduction clonale, la diversité génétique présente au sein des populations tendra à augmenter sous l'effet des recombinaisons génétiques. En effet, la reproduction sexuée a significativement contribué à l'augmentation de la diversité génétique dans les pays nordiques (Brurberg *et al.*, 1999). Nous avons observé lors de ce travail de thèse que la diversité génotypique déterminée par microsatellites dans les populations pathogènes prélevées en 2004 et 2005 est significativement plus importante dans la population du nord de la France ( $H_s = 3.337$ ) que dans les deux populations bretonnes ( $H_s = 2.497$  et  $H_s = 2.819$ ). Il peut en résulter l'apparition de nouvelles souches, dont la survie et l'expansion ultérieure dépendra de leur degré d'adaptation aux conditions environnementales (climat, variétés, etc....).

La formation d'oospores est un avantage certain pour la survie inter-épidémique chez les organismes ayant des capacités saprophytiques aussi faibles que celles de *P. infestans* (Andrivon, 1995). Cet avantage est plus fort dans les parties du monde aux conditions climatiques extrêmes, que ce soit les étés très chauds du Mexique ou les hivers très froids du Canada ou des pays scandinaves. D'ailleurs, les exemples les plus convaincants de reproduction sexuée viennent de ces régions (Sujkowski *et al.*, 1994 ; Goodwin *et al.*, 1995 ; Anderson *et al.*, 1998). Dans les régions avec des saisons moins contrastées, les opportunités de survie asexuée du pathogène dans des tubercules infectés sont probablement plus fortes et

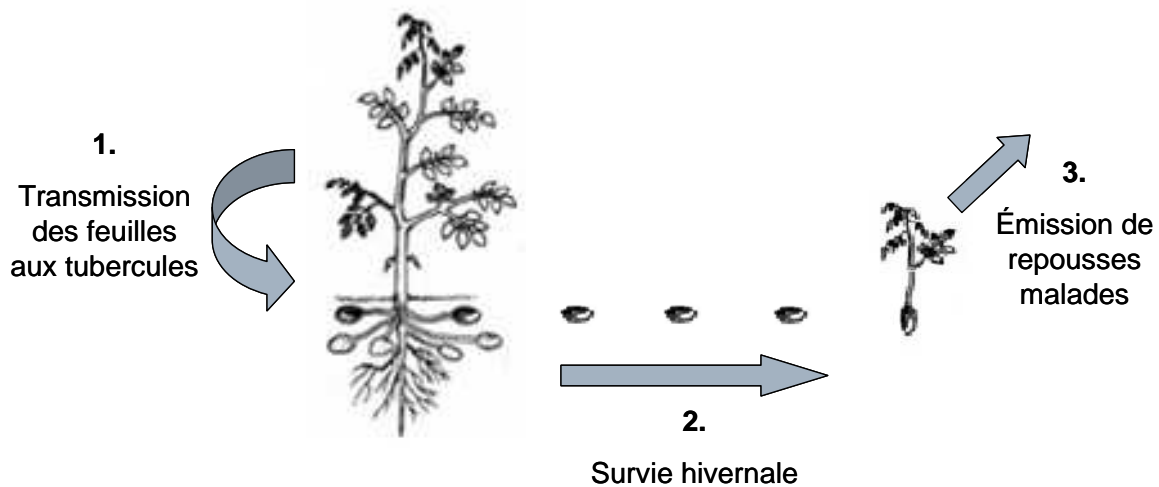
l'inoculum primaire est majoritairement d'origine asexuée, même si la reproduction sexuée est possible (Zwankhuizen *et al.*, 1998).

La situation française est une opportunité pour déterminer les paramètres clés dans l'installation, l'invasion et la persistance des parasites. La compréhension de l'impact du mode de reproduction (sexué ou asexué) sur la diversité génétique et le pouvoir pathogène des populations est essentielle. Le contraste entre le nord de la France, où les souches A2 sont en expansion rapide et où la reproduction sexuée est vraisemblablement active, et la Bretagne où les souches A1 sont quasi exclusivement présentes et où la reproduction est *a priori* toujours clonale, peut permettre de déterminer si la reproduction sexuée élargit la gamme d'agressivité.

Ces éléments permettront de compléter l'analyse des effets sélectifs déjà réalisée, par la prise en compte d'autres mécanismes évolutifs, telle que la recombinaison, susceptibles d'influencer l'évolution des populations pathogènes.

### C. Agressivité et capacité de survie des populations pathogènes

Nos travaux ont montré que les taux de survie hivernale de tubercules infectés par *Phytophthora infestans* ne différaient pas significativement en fonction du niveau d'agressivité des souches inoculées, et ce dans trois sites expérimentaux soumis à des conditions climatiques différentes. Ceci suggère donc que le trade-off attendu entre agressivité et survie n'existe pas chez *P. infestans*, quelles que soient les conditions d'hivernage. Toutefois, l'absence de trade-off entre agressivité et survie ne signifie pas nécessairement qu'il n'y ait pas de trade-off entre agressivité et transmission à la saison suivante. Effectivement, ce trade-off pourrait affecter d'autres phases du cycle de développement de l'agent pathogène. La transmission de *P. infestans* d'une saison à la suivante nécessite trois événements successifs (Fig. 5-6) : i) l'infection des tubercules par l'inoculum produit sur le feuillage, ii) la survie hivernale dans les tubercules, et iii) l'émission de repousses malades à partir des tubercules infectés.

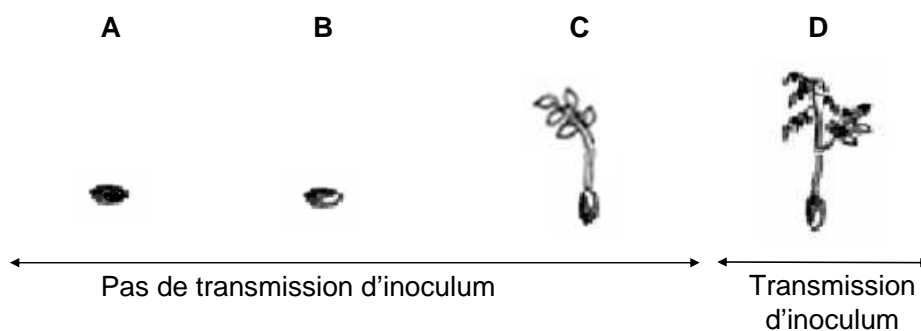


**Figure 5-6 :** La transmission d'une saison culturale à la suivante requiert trois étapes successives.

L'infection des tubercules à partir du feuillage en automne (étape n°1 de la figure 5-6) est un mécanisme passif, résultant du transport des spores par l'eau de pluie (Robertson, 1991). Nous pouvons envisager que le nombre de tubercules contaminés sera plus faible sur les plantes au feuillage infecté par des souches très agressives, par exemple sous l'effet d'une réduction du nombre ou de la taille des tubercules formés par ces plantes. Ceci est certainement très dépendant de l'état d'avancement du cycle biologique de l'hôte au moment de la contamination par l'agent pathogène. Effectivement, les attaques précoces induisent

surtout une diminution de la photosynthèse et donc une réduction du nombre ou de la taille des tubercules, alors que les attaques tardives n'agissent pas sur la phase de tubérisation mais conduisent à une baisse de la qualité des tubercules (Radtke & Rieckmann, 1991). Afin de tester ce trade-off entre agressivité et transmission du feuillage aux tubercules, nous proposons d'inoculer des plantes à différentes phases de leur cycle biologique avec des souches d'agressivité connue, puis de dénombrer les tubercules produits et la proportion de tubercules infectés, en conditions contrôlées et/ou au champ.

Une contre-sélection des souches les plus agressives est également envisageable lors du passage des tubercules au feuillage au printemps suivant (étape n°3 de la figure 5-6), par exemple via une plus faible émission de tiges mildiousées par les tubercules infectés avec les souches les plus agressives. Nos résultats montrent que le nombre de repousses au printemps n'est pas différent selon l'agressivité des souches inoculées, mais dans notre étude, nous n'avons pas distingué les repousses saines des repousses malades. La survie des tubercules est nécessaire, mais pas suffisante pour assurer la transmission asexuée (Fig. 5-7). Les tubercules infectés peuvent mourir dans le sol, produire des repousses tuées par le pathogène avant émergence, produire des repousses non malades, ou produire des repousses malades. Les trois premières situations n'amènent pas d'inoculum au printemps suivant, alors que la dernière permet la transmission du pathogène d'une saison à la suivante. L'hypothèse d'un trade-off lors de cette étape peut être testée en plaçant des tubercules inoculés par des souches d'agressivité connue sous terre pendant un hiver et en dénombrant au printemps suivant le nombre de repousses par tubercule et surtout la proportion de repousses mildiousées. La détection directe du pathogène dans les repousses produites est possible par PCR spécifique simple (Appel *et al.*, 2001 ; Hussain *et al.*, 2005) ou par PCR quantitative (Atallah & Stevenson, 2006), que les infections soient visibles ou latentes.



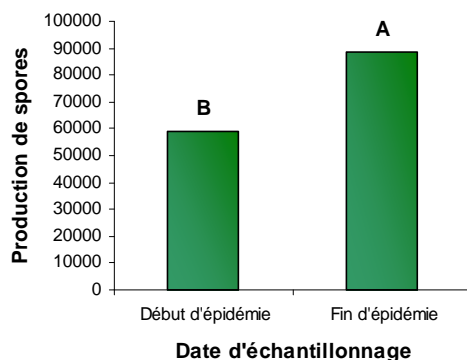
**Figure 5-7 :** Les tubercules infectés peuvent mourir dans le sol (A), produire des repousses tuées par le pathogène avant émergence (B), produire des repousses non malades (C) ou produire des repousses malades (D).

Les résultats présentés dans cette thèse indiquent donc que s'il y a une contre-sélection des souches les plus agressives lors de la phase de survie hivernale, ce n'est certainement pas dû au fait que ces souches détruisent plus rapidement les tubercules qui les hébergent pendant l'hiver (étape n°2 de la figure 5-6). Cependant, des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'effondrement démographique caractérisant la phase de survie hivernale est dépendant du niveau d'agressivité des souches de *P. infestans*.

Ce trade-off devra aussi être testé sur des variétés présentant différents niveaux de résistance au niveau du feuillage et au niveau des tubercules. Effectivement, les expérimentations ont été réalisées ici uniquement avec la variété Bintje, qui est sensible au mildiou du feuillage et du tubercule et pour laquelle l'agressivité sur feuille n'est pas corrélée à l'agressivité sur tubercule (Flier *et al.*, 1998 ; Pasco *et al.*, en préparation). Cette absence de corrélation va dans le sens d'une survie hivernale des souches de *P. infestans* indépendante de leur agressivité pendant l'épidémie, mais ce n'est pas forcément le cas pour toutes les variétés de pomme de terre.

Si l'absence de trade-off entre agressivité et survie hivernale est confirmée par les expérimentations suggérées ci-dessus, alors la sélection pendant la phase épidémique prend bien plus d'importance. Andrivon *et al.* (2007) ont montré que la capacité de sporulation augmente entre le début et la fin d'une épidémie (Fig. 5-8), suggérant qu'une sélection directionnelle pour une augmentation d'agressivité a lieu pendant la phase épidémique. Sans contre-sélection des souches les plus agressives, les niveaux moyens d'agressivité des populations de *P. infestans* doivent augmenter graduellement. Un résultat similaire a été observé dans une population de *Blumeria graminis tritici* (Villareal & Lannou, 2000). Néanmoins, l'augmentation d'agressivité au cours d'une saison a été mise en évidence dans des parcelles expérimentales non traitées et plantées dans des environnements favorables au développement de la maladie. Il est maintenant nécessaire de tester expérimentalement si, et dans quelle mesure, cette sélection directionnelle pour une augmentation d'agressivité est freinée par les applications de fongicides et les épisodes de conditions climatiques défavorables qui interrompent le déroulement du cycle de vie de *P. infestans*.





**Figure 5-8 :** Production de spores selon la date d'échantillonnage des isolats de *Phytophthora infestans* collectés dans une même parcelle de pomme de terre, en 1999. Le prélèvement en début d'épidémie a été réalisé une semaine après l'apparition des symptômes ; le prélèvement réalisé en fin d'épidémie a été réalisé trois semaines plus tard. A et B représentent les groupes homogènes identifiés (test SNK,  $\alpha=0,05$ ). D'après Andrivon *et al.*, 2007 [ANNEXE I].

Par ailleurs, nous avons également montré que dans deux des trois sites expérimentaux, les tubercules inoculés ont germé précocement, de manière plus abondante et plus rapide que les tubercules témoins. Ceci peut être interprété soit comme une manipulation de l'hôte par le parasite, visant à raccourcir la période de dépendance vis-à-vis d'une seule ressource nutritive, soit comme une réponse de l'hôte à l'infection par accélération du cycle biologique pour minimiser les effets négatifs induits par le parasite sur la survie et donc sur la reproduction de l'hôte (Hochberg *et al.*, 1992 ; Sorensen & Minchella, 1998 ; Agnew *et al.*, 1999 ; Fredensborg & Poulin, 2006). Il serait maintenant utile de comprendre le déterminisme de cette germination anticipée, afin de trancher entre ces deux hypothèses évolutives. L'analyse des conditions et modalités de cette germination anticipée devra passer par la recherche d'éventuelles implications hormonales issues de la plante (auxines, gibbérellines) et/ou du parasite (élicitines).

## D. Gestion durable des résistances des plantes aux maladies

### D.1. Conséquences des connaissances acquises pour la gestion des résistances

Ces travaux de thèse ont apporté des informations sur la réponse adaptative des populations d'agents pathogènes au déploiement en culture d'hôtes végétaux. Ces informations, collectées sur l'association *Phytophthora infestans* / *Solanum tuberosum*, peuvent maintenant être utilisées pour une gestion plus efficace de la maladie par des stratégies de déploiement des variétés de pommes de terre appropriées.

i) Le fait que la sélection agisse sur la virulence et sur l'agressivité implique de raisonner la gestion pour les deux types de résistances.

ii) La perspective à court terme de mesurer des coûts de virulence permettra de savoir si certains gènes majeurs de résistance peuvent être utilisés d'une manière durable. Effectivement, si l'acquisition de virulence face à plusieurs gènes de résistance présente un coût, alors ceux-ci pourront être utilisés soit dans un même génotype soit dans différents génotypes déployés en alternance dans le temps ou dans l'espace sans que des races complexes soient aisément sélectionnées.

iii) La variation importante pour l'agressivité dans les populations de *P. infestans* permet une adaptation des populations pathogènes pour l'agressivité, amenant éventuellement à l'érosion des résistances partielles. Ceci est illustré par l'exemple de l'érosion de la variété partiellement résistante Désirée au Maroc, où elle a été déployée largement, qui est toujours efficace en France, où elle n'est que peu cultivée.

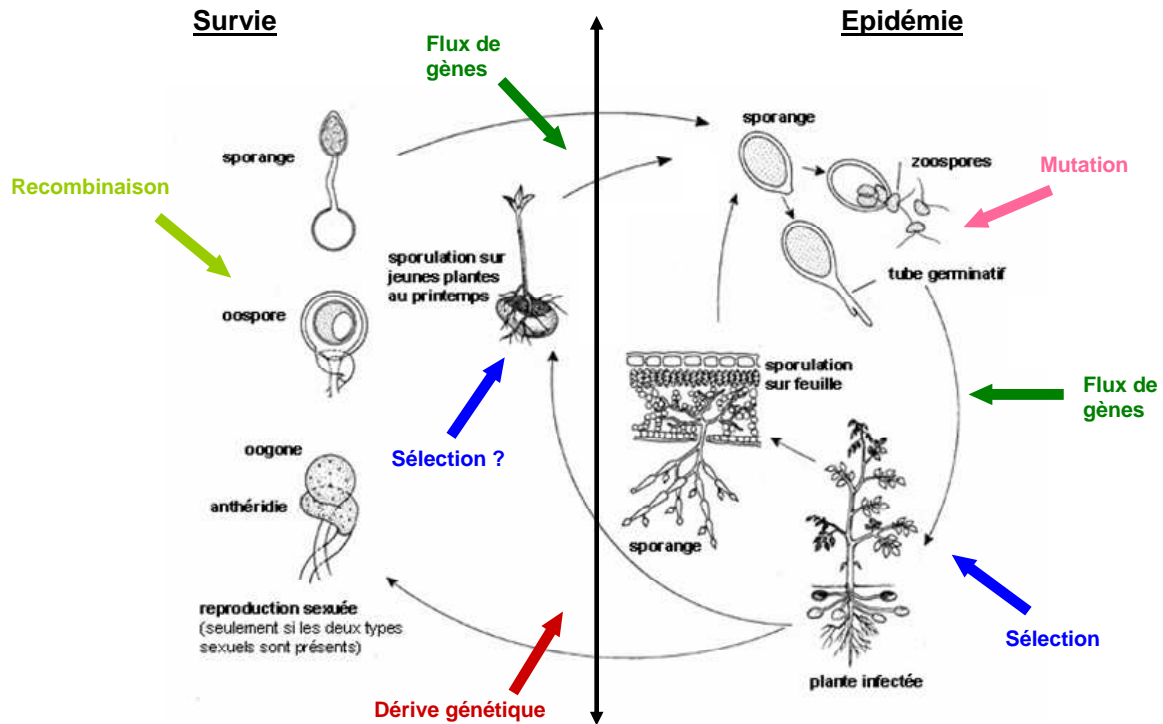
iv) Le processus d'adaptation locale à la variété dominante opère dans ce pathosystème, mais il n'est détectable qu'à une échelle spatiale large. Les populations de *P. infestans* sont donc capables d'évoluer et de s'adapter à une variété de pomme de terre quand celle-ci est déployée à une large échelle spatiale sur une longue période, comme la variété Bintje en France. La culture de Bintje en France est aujourd'hui en baisse (Ludovic Dubois, communication personnelle, 2006). Il est donc important de gérer le déploiement des variétés dans le temps et dans l'espace et d'éviter la dominance d'un cultivar sur de grandes échelles.

v) L'apparition et l'augmentation en fréquence de souches du type sexuel A2 dans la partie nord du pays nécessite de mettre en place des rotations plus longues que celles réalisées

actuellement. Bodker *et al.* (2006) ont montré au Danemark, où la formation d'oospores a été mise en évidence, que les épidémies commencent plus tôt dans les parcelles ayant accueilli des pommes de terre l'année précédente ou deux années plus tôt, en comparaison aux parcelles ayant accueilli des pommes de terre au moins trois années auparavant.

vi) S'il y a une contre-sélection des souches les plus agressives lors de la phase de survie hivernale, ce n'est pas dû au fait que ces souches tuent plus rapidement les tubercules qui les hébergent pendant l'hiver.

vii) L'ensemble des forces évolutives doit être pris en compte pour décrire et comprendre la réponse adaptative des populations pathogènes. Effectivement, les populations de *P. infestans* présentent une dynamique d'extinction et de recolonisation caractéristique des métapopulations (Burdon & Silk, 1997). Nos données moléculaires, ainsi que d'autres travaux comme par exemple ceux de Zwankhuizen *et al.* (2000), illustrent cette dynamique de métapopulation en montrant que des génotypes présents une saison peuvent disparaître et être remplacés par d'autres la saison suivante. Ceci peut être illustré en replaçant les différentes forces évolutives dans le cycle de développement de *P. infestans* (Fig. 5-9). Les populations passent par un important goulot d'étranglement à la fin de la saison culturale, correspondant à une réduction importante de la taille des populations. Comme nous l'avons vu, la dérive génétique joue alors un rôle important sur la structure génétique des populations de *P. infestans*, et sur l'échelle spatiale à laquelle l'adaptation locale est détectable. Lors de la survie hivernale, la recombinaison peut diversifier les populations de *P. infestans* lorsque celles-ci sont capables de se reproduire sexuellement (c'est-à-dire lorsqu'elles sont constituées de souches A1 et de souches A2) ; la sélection peut également structurer les populations clonales survivant dans les tubercules, via par exemple une contre-sélection des souches les plus agressives. L'échelle spatiale et les flux de gènes ont un impact important sur la capacité d'adaptation locale des populations de *P. infestans*, lors des migrations de recolonisation primaire au printemps suivant (à partir des différentes formes de survie hivernale) et secondaire lors de la succession de cycles épidémiques. La mutation apporte de la variabilité dans les populations pathogènes, essentiellement pendant la phase épidémique durant laquelle la taille des populations (et donc le nombre absolu de mutants) est la plus importante, et permet par exemple le contournement des gènes majeurs de résistance. La sélection imposée par les caractéristiques de l'habitat (l'hôte, mais aussi l'environnement) structure également fortement les populations pathogènes lors de la phase épidémique.



**Figure 5-9 :** Représentation schématique des différentes forces évolutives agissant sur le déroulement du cycle du mildiou de la pomme de terre. Cycle d'après : <http://www.apsnet.org>.

#### D.2. Limites actuelles et apports de la modélisation

Actuellement, l'évaluation de la durabilité d'une résistance (ou d'une stratégie de gestion) reste essentiellement rétrospective et réalisée au cas par cas. Ainsi, Johnson (1984) définit une résistance durable comme une résistance ayant maintenu son efficacité quand elle a été déployée pendant longtemps, sur de grandes surfaces et en présence de l'agent pathogène visé. Une telle évaluation est souvent explicative, mais peu prédictive. En effet, trop de paramètres entrent en jeu simultanément dans chaque cas particulier étudié pour pouvoir aisément dégager des règles génériques quant aux déterminants essentiels du caractère durable ou non (nature de la résistance, voire fonction du ou des gènes impliqués ; structure des populations parasites ; échelles spatiales et temporelles considérées ...). Cette évaluation *a posteriori* présente également le désavantage majeur de ne pouvoir étudier certaines des stratégies à l'échelle spatiale et temporelle la plus appropriée, faute de dispositifs expérimentaux suffisants. Ainsi, à part dans de rares cas, les mélanges ou associations de variétés n'ont jamais été évaluées comme des stratégies de gestion des

résistances à des échelles supérieures à la parcelle, alors que les parasites concernés sont susceptibles de dissémination à grande distance.

Une approche alternative consiste à construire des outils de simulation de la durabilité des résistances basés sur la modélisation spatiale et temporelle de l'évolution des structures de populations parasites confrontées à des hôtes résistants. La construction de tels modèles suppose i) une connaissance des patrons de sélection dans les populations concernées en réponse au déploiement de résistances (totales ou partielles) ; ii) l'analyse des coûts de fitness associés aux différents phénotypes pathogènes (virulence/avirulence vis-à-vis de gènes majeurs ; agressivité vis-à-vis de résistances partielles) ; et iii) le développement de modèles spatialement explicites de la dynamique des différents génotypes/phénotypes composant la population pathogène. Un tel modèle devra permettre de tester des scénarii de déploiement des variétés non testables expérimentalement. Il pourra orienter les schémas d'amélioration des plantes, mais aussi la façon de déployer ces résistances dans le temps et dans l'espace.

Les données sur l'adaptation des populations de *P. infestans* au déploiement des variétés de pomme de terre, collectées lors de cette thèse, pourront être mises à profit pour paramétrer des modèles génériques d'adaptation pour l'agressivité développés par F. Van den Bosch et C. Gilligan (Van den Bosch & Gilligan, 2003 ; Gudelj *et al.*, 2004). Ces modèles, actuellement limités à une entité spatiale (parcelle) peuvent être étendus pour prendre en compte le fonctionnement d'une métapopulation pathogène (réseau de parcelles unitaires connectées par des flux prenant en compte migration et survie). Après validation, ces modèles pourront être utilisés pour tester des scénarii d'utilisation des variétés (proportions, arrangements spatiaux et temporels, itinéraires techniques...) et leurs effets sur la structure des populations pathogènes.

## *Références bibliographiques*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agnew, P., Bedhomme, S., Haussy, C. & Michalakakis, Y. (1999) Age and size at maturity of the mosquito *Culex pipiens* infected by the microsporidian parasite *Vavraia culicis*. *Proc. R. Soc. London B* **266**: 947-952.
- Agrios, G.N. (1997) *Plant Pathology*, 4<sup>th</sup> edn. Academic Press, San Diego.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M. (1994) *Phytophthora infestans*. In: *Introductory Mycology*, 4<sup>th</sup> edn. (John Wiley and Sons eds.), pp.717-720. New York.
- Anderson, B., Sandström, M. & Strömberg, A. (1998) Indications of soil borne inoculum of *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* **41**: 305-310.
- Anderson, R.M. & May, R. (1982) Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* **85**: 411-426.
- Andrison, D. (1993) Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* **83**: 889-890.
- Andrison, D. (1994) Races of *Phytophthora infestans* in France, 1991-1993. *Potato Res.* **37**: 279-286.
- Andrison, D. (1995) Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* **85**: 1053-1056.
- Andrison, D. (1996) The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathol.* **45**: 1028-1036.
- Andrison, D., Corbière, R., Ellissèche, D. & Duvauchelle, S. (2001) *Phytophthora infestans* : évolution des populations de mildiou. *La Pomme de Terre Française* **523**: 48-51.
- Andrison, D., Corbière, R., Lebreton, L., Pilet, F., Montarry, J., Pellé, R. & Ellissèche, D. (2004) Host adaptation in *Phytophthora infestans*: a review from a population biology perspective. *Plant. Breed. Seed. Sci.* **50**: 15-27.
- Andrison, D., Corbière, R., Lucas, J.M., Pasco, C., Gravouille, J.M., Pellé, R., Dantec, J.P. & Ellissèche, D. (2003b) Resistance to late blight and soft rot in six potato progenies and glycoalkaloid contents in the tubers. *Am. J. Potato Res.* **80**: 125-134.
- Andrison, D. & de Vallavieille Pope, C. (1995) Race diversity and complexity in selected populations of fungal biotrophic pathogens of cereals. *Phytopathology* **85**: 897-905.

- Andrивon, D., Lucas, J.M. & Ellissèche, D. (2003a) Development of natural late blight epidemics in pure and mixed plots of potato cultivars with different levels of partial resistance. *Plant Pathol.* **52**: 586-594.
- Andrивon, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E.H., Pellé, R. & Ellissèche, D. (2007) Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* in press.
- Appel, R., Adler, N. & Habermeyer, J. (2001) A method for the artificial inoculation of potato tubers with *Phytophthora infestans* and polymerase chain reaction assay of latently infected sprouts and stems. *J. Phytopathol.* **149**: 287-292.
- Atallah, Z.K. & Stevenson, W.R. (2006) A methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology* **96**: 1037-1045.
- Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I. & Voltz, M. (2005) *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux*. Expertise scientifique collective, INRA/Cemagref.
- Avila-Adame, C., Gomez-Alpizar, L., Zismann, V., Jones, K.M., Buell, C.R. & Ristaino, J.B. (2006) Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. *Curr. Genet.* **49**: 39-46.
- Barrett, J.A. (1988) Frequency-dependent selection in plant-fungal interactions. *Philos. Trans. R. Soc. London B* **319**: 473-483.
- Bayles, R.A., Flath, K., Hovmoller, M.S. & de Vallavieille-Pope, C. (2000) Breakdown of the Yr 17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie* **20**: 805-811.
- Bedin, P. (1986) Le mildiou de la pomme de terre. *La Pomme de Terre Française* **434**: 113-115.
- Bjor, T. (1987) Testing the resistance of potato genotypes to tuber blight. *Potato Res.* **30**: 525-532.
- Bjor, T. & Mulelid, K. (1991) Differential resistance to tuber late blight in potato cultivars without R-genes. *Potato Res.* **34**: 3-8.
- Black, W., Mastenbroek, C., Wills, W.R. & Petersen, L.C. (1953) A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity of *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica* **2**: 173-179.
- Bodker, L., Pedersen, H., Kristensen, K., Moller, L., Lehtinen, A. & Hannukkala, A. (2006) Influence of crop history of potato on early occurrence and disease severity of potato



- late blight caused by *Phytophthora infestans*. *Ninth Workshop of an european Network for Development of an integrated Control Strategy of Potato Late Blight* (C.E. Westerdijk & H.T.A.M. Schepers eds.), Tallinn (Estonia), 19-23 October 2005, pp. 53-56.
- Bourke, P.M.A. (1964) Emergence of potato blight, 1843-46. *Nature* **203**: 805-808.
- Boyd, A.E.W. (1974) Sources of potato blight (*Phytophthora infestans*) in the east of Scotland. *Plant Pathol.* **23**: 30-36.
- Brasier, C.M. (1987) The dynamics of fungal speciation. In: *Evolutionary Biology of the Fungi* (A.D.M. Rayner, C.M. Brasier & D. Moore eds.), pp. 231-260. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Brasier, C.M. (1990) The unexpected element: mycovirus involvement in the outcome of two recent pandemics, dutch elm disease and chesnut blight. In: *Pests, Pathogens and Plant Communities* (J.J. Burdon & S.R. Leather eds.), pp. 289-307. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Bronson, C.R. & Ellingboe, A.H. (1986) The influence of four unnecessary genes for virulence on the fitness of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* **76**: 154-158.
- Brown, J.K.M. (1994) Chance and selection in the evolution of barley mildew. *Trends Microbiol.* **2**: 470-475.
- Brown, J.K.M. & Mogens, S. (2002) Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* **297**: 537-541.
- Browning, J.A. (1974) Relevance of knowledge about natural ecosystems to development of pest management programs for agro-ecosystems. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* **1**: 191-199.
- Bruehl, G.W. (1987) *Soilborne Plant Pathogens*. Macmillan, New York.
- Brurberg, M.B., Hannukkala, A. & Hermansen, A. (1999) Genetic variability of *Phytophthora infestans* in Norway and Finland as revealed by mating type and fingerprint probe RG57. *Mycol. Res.* **103**: 1609-1615.
- Burdon, J.J. (1993a) The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 305-323.
- Burdon, J.J. (1993b) Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance. In: *Durability of Disease Resistance* (Th. Jacobs & J.E. Parlevliet eds.), pp.41-56. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Burdon, J.J. & Silk, J. (1997) Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology* **87**: 664-669.
- Burdon, J.J. & Thrall, P.H. (1999) Spatial and temporal patterns in coevolving plant and pathogen associations. *Am. Nat.* **153**: S15-S33.
- Burdon, J.J. & Thrall, P.H.. (2000) Coevolution at multiple spatial scales: *Linum marginale-Melampsora lini*; from the individual to the species. *Evol. Ecol.* **14**: 261-281.
- Burnet, M. & White, D.O. (1972) *Natural History of infectious Disease*, 4<sup>th</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Carson, M.L. (1998) Aggressiveness and perennation of isolates of *Cochliobolus heterostrophus* from North Carolina. *Plant Dis.* **82**: 1043-1047.
- Carter, D.A., Buck, K.W., Archer, S.A., Van der Lee, T., Shattock, R.C. & Shaw, D.S. (1999) The detection of nonhybrid, trisomic, and triploid offspring in sexual progeny of a mating of *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.* **26**: 198-208.
- Caten, C. E. (1974) Intra-racial variation in *Phytophthora infestans* and adaption to field resistance for potato blight. *Ann. Appl. Biol.* **77**: 259-270.
- Coffey, M.D. & Gees, R. (1991) The cytology of development. In: *Advances in Plant Pathology vol. 7 - Phytophthora infestans, the Cause of Late Blight of Potato* (D.S. Ingram & P.H. Williams eds.), pp. 31-51. Academic Press, London.
- Crute, I.R., Norwood, J.M. & Gordon, P.L. (1987) The occurrence, characteristics and distribution in the United Kingdom of resistance to phenylamide fungicides in *Bremia lactucae* (lettuce downy mildew). *Plant Pathol.* **36**: 297-315.
- Darwin, C.R. (1859) *L'origine des Espèces* (Traduit par E. Barbier). Edition de 1985. La Découverte, Paris.
- Davelos, A.L., Alexander, H.M. & Slade, N.A. (1996) Ecological genetic interactions between a clonal host plant (*Spartina pectinata*) and associated rust fungi (*Puccinia seymouriana* and *Puccinia sparganioides*). *Oecologia* **105**: 205-213.
- Dawkins, R. (1976) *The selfish Gene*. Oxford University Press, New York.
- Day, T. (2003) Virulence evolution and the timing of disease life-history events. *Trends Ecol. Evol.* **18**: 113-118.
- Day, J.P. & Shattock, R.C. (1997) Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**: 379-391.
- Delmotte, F., Bucheli, E. & Shykoff, J. (1999) Host and parasite population structure in a natural plant-pathogen system. *Heredity* **82**: 300-308.

- Détourné, D., Duvauchelle, S. & Dubois, L. (2004) De 1993 à 2003, caractérisation des populations de mildiou. *La Pomme de Terre Française* **541**: 38-40.
- Dias, P.C. (1996) Sources and sinks in population biology. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 326-330.
- Drenth, A., Janssen, E.M. & Govers, F. (1995) Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathol.* **44**: 86-94.
- Dron, M., Geffroy, V. & Adam-Blondon, A.Z. (1995) Chez les plantes aussi des gènes font de la résistance. *La Recherche* **26**: 462-463.
- Dubois L. & Duvauchelle S. (2005) Bilan phytosanitaire 2005 de la pomme de terre. *Phytoma-La Défense des Végétaux* **588**: 20-22.
- Dufva, R. (1996) Sympatric and allopatric combinations of hen fleas and great tits: a test of local adaptation hypothesis. *J. Evol. Biol.* **9**: 505-510.
- Duvauchelle, S., Dubois, L., N'Guyen, N. & Pinchon, V. (2000) Modèle MILSOL, Adaptation à la sensibilité variétale au mildiou. *La Pomme de Terre Française* **516**: 24-27.
- Duvauchelle, S., Lherbier, V., Emery, D., Sarniguet, C., Lebreton, L., Andrivon, D., Gisi, U., Knapova, G. & Edel, D. (1997) Répartition des souches A2 de *Phytophthora infestans* en France en 1996. 5<sup>ème</sup> Conf. Internationale sur les Maladies des Plantes. Tours, France. pp. 369-374.
- Dybdahl, M.F. & Storfer, A. (2003) Parasite local adaptation: red queen versus suicide king. *Trends Ecol. Evol.* **18**: 523-530.
- Ebert, D. (1998) Experimental evolution of parasites. *Science* **282**: 1432-1435.
- Ebert, D. & Bull, J. (2003) Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends Microbiol.* **11**: 15-20.
- Ebert, D. & Hamilton, W.D. (1996) Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 79-82.
- Ebert, D. & Weisser, W. (1997) Optimal killing for obligate killers: the evolution of life histories and virulence of semelparous parasites. *Proc. R. Soc. London B* **264**: 985-991.
- Elbaz, A., Levecque, C., Clavel, J., Vidal, J.S., Richard, F., Amouyel, P., Alperovitch, A., Chartier-Harlin, M.C. & Tzourio, C. (2004) CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **55**: 430-434.
- Ellissèche, D., Pellé, R. & Andrivon, D. (1999) Résistance variétale au mildiou : situation et perspectives. *La Pomme de Terre Française* **510**: 16-22.

- Ennos, R.A. & McConnell, K.C. (1995) Using genetic markers to investigate natural selection in fungal populations. *Can. J. Bot.* **73**: S302-S310.
- Euzet, L. & Combes, C. (1980) Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. In: *Les Problèmes de l'Espèce dans le Règne animal* (C. Bosquet, J. Genermont & M. Lamotte eds.), Société zoologique de France, Paris.
- Ewald, P.W. (1983) Host-parasite relations, vectors and the evolution of disease severity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **14**: 465-485.
- Ewing, E.E., Simko, I., Smart, C.D., Bonierbale, M.W., Mizubuti, E.S.G., May, G.D. & Fry, W.E. (2000) Genetic mapping of qualitative and quantitative field resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Mol. Breed.* **6**: 25-36.
- Flier, W.G., Grünwald, N.J., Kroon, L.P.N.M., Sturbaum, A.K., van den Bosch, T.B.M., Garay-Serrano, E., Lozoya-Saldana, H., Fry, W.E. & Turkensteen, L.J. (2003b) The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca Valley of central Mexico suggests genetic differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. *Phytopathology* **93**: 382-390.
- Flier, W.G. & Turkensteen, L.J. (1999) Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**: 381-388.
- Flier, W.G., Turkensteen, L.J. & Mulder, A. (1998) Variation in tuber pathogenicity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Potato Res.* **41**: 345-354.
- Flier, W.G., Van den Bosch, G.B.M. & Turkensteen, L.J. (2003a) Stability of partial resistance in potato cultivars exposed to aggressive strains of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* **52**: 326-337.
- Flor, H.H. (1953) Epidemiology of flax rust in the North Central States. *Phytopathology* **43**: 624-628.
- Flor, H.H. (1956) The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* **8**: 29-54.
- Flor, H.H. (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275-296.
- Forbes, G.A., Goodwin, S.B., Drenth, A., Oyarzun, P., Ordonez, M.E. & Fry, W.E. (1998) A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* **82**: 811-818.
- Frank, S.A. (1996) Models of parasite virulence. *Q. Rev. Biol.* **71**: 37-78.

- Fredensborg, B.L. & Poulin, R. (2006) Parasitism shaping host life-history evolution: adaptive responses in a marine gastropod to infection by trematodes. *J. An. Ecol.* **75**: 44-53.
- Frinking, H.D., Davidse, L.C. & Limburg, H. (1987) Oospore formation by *Phytophthora infestans* in host tissue after inoculation with isolates of opposite mating type found in the Netherlands. *Phytopathology* **81**: 1330-1336.
- Fry, J.D. (1996) The evolution of host specialization: are trade-offs overrated? *Am. Nat.* **148**: S84-S107.
- Fry, W.E., Goodwin, S.B., Dyer, A.T., Matuszak, J.M., Drenth, A., Tooley, P.W., Sujkowski, L.S., Koh, Y.J., Cohen, B.A., Spielman, L.J., Deahl, K.L., Inglis, D.A. & Sandlan, K.P. (1993) Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Dis.* **77**: 653-661.
- Fry, W.E., Goodwin, S.B., Matuszak, J.M., Spielman, L.J., Milgroom, M.G. & Drenth, A. (1992) Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: 107-130.
- Galanaud, J.P., Elbaz, A., Clavel, J., Vidal, J.S., Corree, J.R., Alperovitch, A. & Tzourio, C. (2005) Cigarette smoking and Parkinson's disease: A case-control study in a population characterized by high prevalence of pesticide exposure. *Movement Disord.* **20**: 181-189.
- Gallais, A. (1990) *Théorie de la Sélection en Amélioration des Plantes*. Masson, Paris.
- Gandon, S. & Michalakis, Y. (2000) Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proc. R. Soc. London B* **267**: 985-990.
- Gandon, S. & Michalakis, Y. (2002) Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *J. Evol. Biol.* **15**: 451-462.
- Gandon, S., Capowiez, Y., Dubois, A., Michalakis, Y. & Olivieri, I. (1996) Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proc. R. Soc. London B* **263**: 1003-1009.
- Gandon, S., Ebert, D., Olivieri, I. & Michalakis, Y. (1998) Differential adaptation in spatially heterogeneous environments and host-parasite coevolution. In: *Genetic Structure and Local Adaptation in Natural Insect Populations* (S. Mopper & S. Strauss eds.), pp. 325-340. Chapman & Hall, London.
- Gandon, S. & Van Zandt, P.A. (1998) Local adaptation and host-parasite interactions. *Trends Ecol. Evol.* **13**: 214-216.

- Ganusov, V., Bergstrom, C. & Antia, R. (2002) Within-host population dynamics and the evolution of microparasites in a heterogeneous host population. *Evolution* **56**: 213-223.
- Gaucher, D., Duvauchelle, S. & Andrivon, D. (1998) Mildiou de la pomme de terre – le champignon évolue, la lutte aussi ! *Perspectives Agricoles* **236**: 1-20.
- Gisi, U. & Cohen, Y. (1996) Resistance to phenylamide fungicides : a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 549-572.
- Goodwin, S.B. (1997) The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* **87**: 462-473.
- Goodwin, S.B., Sujkowski, L.S. & Fry, W.E. (1995) Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology* **85**: 669-676.
- Gould, F., Kennedy, G.G. & Johnson, M.T. (1991) Effects of natural enemies on the rate of herbivore adaptation to resistant host plants. *Entomol. Exp. Appl.* **58**: 1-14.
- Groth, J.V. & Roelfs, A.P. (1987) The concept and measurement of phenotypic diversity in *Puccinia graminis* on wheat. *Phytopathology* **77**: 1395-1399.
- Grünwald, N.J. & Flier, W.G. (2005) The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 171-190.
- Grünwald, N.J., Rubio-Covarrubios, O.A. & Fry, W.E. (2000) Potato late blight management in the Toluca Valley: forecasts and resistant cultivars. *Plant. Dis.* **84**: 410-416.
- Gudelj, I., Van den Bosch, F. & Gilligan, C.A. (2004) Transmission rates and adaptive evolution of pathogens in sympatric heterogeneous plant populations. *Proc. R. Soc. London B* **271**: 2187-2194.
- Guérin, F & Le Cam, B. (2004) Breakdown of the scab resistance gene *Vf* in apple leads to a founder effect in populations of the fungal pathogen *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **94**: 364-369.
- Hamilton, W.D., Axelrod, R. & Tanese, R. (1990) Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3566-3573.
- Hammi, A., Bennani, A., El Ismaili, A., Msatef, Y. & Serrhini, M.N. (2001) Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Morocco. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 553-556.
- Hammond-Kosack, K.E & Jones, J.D (1997) Plant diseases resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 575-607.

- Hammond-Kosack, K.E. & Parker, J.E. (2003) Deciphering plant-pathogen communication; fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 177-183.
- Hampton, M.C. (1992) Some thoughts on demography of the great potato famine. *Plant. Dis.* **76**: 1284-1286.
- Hannukkala, A., Anderson, B., Hansen, J.G., Hermansen, A., Nielsen, B., Lehtinen, A. & Yuen, J. (2005) Phenotypic characteristics of Nordic potato late blight population. 16<sup>th</sup> Triennial Conference of the EAPR, July 17-22, 2005, Bilbao, Basque Country, pp. 223-225.
- Hanski, I. (1998) Metapopulation dynamics. *Nature* **396**: 41-49.
- Hanski, I. (1999) *Metapopulation Ecology*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Harper, J.L. (1977) *Population Biology of Plants*. Academic Press, New York.
- Harrison, J.G. (1992) Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage – a review. *Plant Pathol.* **41**: 384-416.
- Harrison, S. & Hastings, A. (1996) Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends Ecol. Evol.* **11**: 180-183.
- Hastings, A. (1983) Can spatial selection alone lead to selection for dispersal? *Theor. Pop. Biol.* **24**: 244-251.
- Helgeson, J.P., Pohlman, J.D., Austin, S., Haberlach, G.T., Wielgus, S.M., Ronis, D., Zambolim, L., Tooley, P., McGrath, J.M., James, R.V. & Stevenson, W.R. (1998) Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 738-742.
- Heller, R., Esnault, R. & Lance, C. (2000) *Physiologie végétale, tome 2 : Développement*, 6<sup>ème</sup> édition. Dunod, Paris.
- Hermansen, A., Hannukkala, A., Naerstad, R.H. & Brurberg, M.B. (2000) Variation in populations of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant Pathol.* **49**: 11-22.
- Hochberg, M.E., Michalakis, Y. & de Meeus, T. (1992) Parasitism as a constraint on the rate of life-history evolution. *J. Evol. Biol.* **5**: 491-504.
- Hogenboom, N.G. (1993) Economic importance of breeding for disease resistance. In: *Durability of Disease Resistance* (T. Jacobs & J.E. Parlevliet eds.), pp. 5-9. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Hohl, H.R. & Iselin, K. (1984) Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland and with A2 mating type behavior. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **83**: 529-531.

- Hovmoller, M. S., Ostergard, H. & Munk, L. (1997) Modelling virulence dynamics of airborne plant pathogens in relation to selection by host resistance in agricultural crop. *In: The Gene-for-Gene Relationship in Host-Parasite Interactions* (I. R. Crute, J. J. Burdon & E. B. Holub eds.), pp. 173-190. CAB international, Oxon.
- Hussain, S., Lees, A.K., Duncan, J.M. & Cooke, D.E.L. (2005) Development of a species-specific and sensitive detection assay for *Phytophthora infestans* and its application for monitoring of inoculum in tubers and soil. *Plant Pathol.* **54**: 373-382.
- Hutcheson, K. (1970) A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *J. Theor. Biol.* **29**:151-154.
- Inglis, D.A., Johnson, D.A., Legard, D.E., Fry, W.E. & Hamm, P.B. (1996) Relative resistances of potato clones in response to new and old populations of *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* **80**: 575-578.
- Isaac, S. (1992) *Fungal-Plant Interaction*. Chapman & Hall, London.
- Janzen, D.H. (1980) When is it coevolution? *Evolution* **34**: 611-612.
- Jarosz, A.M. & Davelos A.L. (1995) Effects of disease in wild populations and the evolution of pathogen aggressiveness. *New Phytol.* **129**: 371-387.
- Jeffrey, S.I.B., Jinks, J.C. & Grindle, M. (1962) Intraracial variation in *Phytophthora infestans* and field resistance to potato blight. *Genetica* **32**: 323-338.
- Jensen, J.L. (1887) Moyens de combattre et de détruire le *Peronospora* de la pomme de terre. *Mém. Soc. Nat. Agric. France, T. 131*. 130 pp.
- Jensen, N.F. (1952) Intra-varietal diversification in oat breeding. *Agron. J.* **44**: 50-54.
- Jermy, T. (1984) Evolution of insect/host relationship. *Am. Nat.* **124**: 609-630.
- Jinks, J.L. & Grindle, M. (1963) Chances induced by training in *Phytophthora infestans*. *Heredity* **18**: 245-264.
- Johnson, R. (1979) The concept of durable resistance. *Phytopathology* **69**: 198-199.
- Johnson, R. (1981) Durable resistance: definition of genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* **71**: 567-568.
- Johnson, R. (1984) A critical analysis of durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**: 309-330.
- Jolivet, E. (1969) Physiologie de la tubérisation. *Ann. Physiol. Veg.* **11**: 265-301.
- Judelson, H.S., Spielman, L.J. & Shattock, R.C. (1995) Genetic mapping and non-mendelian segregation of mating type loci in the Oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* **141**: 503-512.



- Kaltz, O. & Shykoff, J.A. (1998) Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity* **81**: 361-370.
- Kaltz, O. & Shykoff, J.A. (2002) Within- and among-population variation in infectivity, latency and spore production in a host-pathogen system. *J. Evol. Biol.* **15**: 850-860.
- Kaltz, O., Gandon, S., Michalakis, Y. & Shykoff, J.A. (1999) Local maladaptation in the anther-smut fungus *Microbotryum violaceum* to its host plant *Silene latifolia*: evidence from a cross-inoculation experiment. *Evolution* **53**: 395-407.
- Karn, M.N. & Penrose, L.S. (1951) Birth weight and gestation time in relation to maternal age, parity, and infant survival. *Ann. Eugenics* **16**: 147-164.
- Kassen, R. (2002) The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* **15**: 173-190.
- Kato, M., Mizubuti, E.S., Goodwin, S.B. & Fry, W.E. (1997) Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* **87**: 973-978.
- Kawecki, T.J. (1998) Red Queen meets Santa Rosalia: arms races and the evolution of host specialization in organisms with parasitic lifestyles. *Am. Nat.* **152**: 635-651.
- Kawecki, T.J. (2004) Source-sink population dynamics and its evolutionary consequences. In: *Metapopulation Dynamics* (I. Hanski. & O.E. Gaggiotti eds.), pp. 387-414. Academic Press, Oxford.
- Kawecki, T.J. & Ebert, D. (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* **7**: 1225-1241.
- Kirchner, J.W. & Roy, B.A. (2002) Evolutionary implications of host-pathogen specificity: fitness consequences of pathogen virulence traits. *Evol. Ecol. Res.* **4**: 27-48.
- Kisdi, E. (2002) Dispersal: risk spreading versus local adaptation. *Am. Nat.* **159**: 579-596.
- Kiyosawa, S. (1982) Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **20**: 93-117.
- Knapova, G. & Gisi, U. (2002) Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathol.* **51**: 641-653.
- Koella, J.C. & Agnew, P. (1999) A correlated response of a parasite's virulence and life cycle to selection on its host's life history. *J. Evol. Biol.* **12**: 70-79.
- Kolmer, J.A. & Leonard, K.J. (1986) Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn hosts with partial resistance. *Phytopathology* **76**: 774-777.

- Krause, R.A., Massie, L.B. & Hyre, R.A. (1975) Blitecast, a computerized forecast of potato late blight. *Plant Dis.* **59**: 95-98.
- Kroon, L.P.N.M., Bakker, F.T., van den Bosch, G.B.M., Bonants, P.J.M & Flier, W.G. (2004) Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 766-782.
- Ladle, R.J. (1992) Parasite and sex: catching the Red Queen. *Trends Ecol. Evol.* **7**: 405-408.
- Lajeunesse, M.J. & Forbes, M.R. (2002) Host range and local parasite adaptation. *Proc. Biol. Sci.* **269**: 703-710.
- Lamarck, J.B. (1809) *Philosophie zoologique*. Edition de 1994. Flammarion, Paris.
- Lapwood, D.H. (1977) Factors affecting the field infection of potato tubers of different cultivars by blight (*Phytophthora infestans*). *Ann. Appl. Biol.* **85**: 23-45.
- Leach, J.E., Cruz, C.M.V., Bai, J.F. & Leung, H. (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 187-224.
- Lebreton, L. & Andrivon, D. (1998) French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**: 583-594.
- Lebreton, L., Laurent, C. & Andrivon, D. (1998) Evolution of *Phytophthora infestans* populations in the two most important potato production areas of France during 1992-96. *Plant Pathol.* **47**: 427-439.
- Lebreton, L., Lucas, J.M. & Andrivon, D. (1999) Aggressiveness and competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato and tomato in France. *Phytopathology* **89**: 679-686.
- Lebreton, L., Lucas, P., Dugas, F., Guillermin, A.Y., Schoeny, A. & Sarniguet, A. (2004) Changes in population structure of the soilborne fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* during continuous wheat cropping. *Environ. Microbiol.* **6**: 1174-1185.
- Lees, A.K., Wattier, R., Shaw, D.S., Sullivan, L., Williams, N.A. & Cooke, D.E.L. (2006) Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathol.* **55**: 311-319.
- Lehman, J.S. & Shaner, G. (1996) Genetic variation in latent period among isolates of *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* on partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **86**: 633-641.
- Lehman, J.S. & Shaner, G. (1997) Selection of populations of *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar. *Phytopathology* **87**: 170-176.

- Lehman, T. (1993) Ectoparasitism: direct impact on host fitness. *Parasitol. Today* **9**: 8-13.
- Lehtinen, A. & Hannukkala, A. (2004) Oospores of *Phytophthora infestans* in soil provide an important new source of primary inoculum in Finland. *Agr. Food Sci.* **13**: 399-410.
- Leonard, K.J. (1969) Selection in heterogeneous populations of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. *Phytopathology* **59**: 1851-1857.
- Lepoivre, P. (2003) *Phytopathology*. De Boeck Université, Bruxelles.
- Leung, H., Nelson, R.J. & Leach, J.E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. In: *Advances in Plant Pathology*, vol 10 (J.H. Andrews & I.C. Tommenup eds.), pp. 157-205. Academic Press, New York.
- Linde, C., Zhan, J. & McDonald, B.A. (2002) Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology* **92**: 946-955.
- Lipsitch, M. & Moxon, E. (1997) Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? *Trends Microbiol.* **5**: 31-37.
- Lively, C.M. (1996) Host-parasite coevolution and sex. *Bioscience* **46**: 107-114.
- Lively, C.M. (1999) Migration, virulence and the geographic mosaic of adaptation by parasites. *Am. Nat.* **153**: S34-S47.
- Luderer, R. & Joosten, M.H.A.J. (2001) Avirulence proteins of plant pathogens: determinants of victory and defeat. *Mol. Plant. Pathol.* **2**: 355-364.
- Madec, P. (1966) Croissance et tubérisation chez la pomme de terre. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.* **12**: 159-173.
- Mahuku, G., Peters, R.D., Platt, H.W. & Daayf, F. (2000) Random amplified polymorphic DNA analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994-96. *Plant Pathol.* **49**: 252-260.
- Malcolmson, J.F. & Black, W. (1966) New R genes in *Solanum demissum* and their complementary races of *Phytophthora infestans*. *Euphytica* **15**: 199-203.
- Martens, J.W., Clark, R.V. & Seaman, W.L. (1985) Virulence combinations in sexually and asexually reproducing populations of *Puccinia graminis avenae* in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* **7**: 127-131.
- May, R.M. & Anderson, R.M. (1990) Parasite-host coevolution. *Parasitology* **100**: S89-S101.
- McDonald, B. A. (1997) The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* **87**:448-453.
- McDonald, B.A. & Linde, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 349-379.

- Medina, M.V. & Platt, H.W. (1999) Viability of oospores of *Phytophthora infestans* under field conditions in northeastern North America. *Can. J. Plant Pathol.* **21**: 137-143.
- Modawi, R.S., Browder, L.E. & Heyne, E.G. (1985) Reduced receptivity to infection associated with wheat gene *Lr2c* for low reaction of *Puccinia recondite*. *Phytopathology* **75**: 573-576.
- Montarry, J., Corbière, R., Lesueur, S., Glais, I. & Andrivon, D. (2006) Does selection by resistant host trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *J. Evol. Biol.* **19**: 522-531.
- Mundt, C.C., Cower, C. & Garrett, K.A. (2002) Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica* **124**: 245-252.
- Nei, M. & Li, W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5269-5273.
- Niederhauser, J.S. (1991) *Phytophthora infestans*: the Mexican connection. In: *Phytophthora* (J.A. Lucas, R.C. Shattock, D.S. Shaw & L.R. Cooke eds.), pp. 25-45. Cambridge University Press, Cambridge.
- O'Sullivan, E. & Dowley, L.J. (1991) A note on the occurrence of the A2 mating type and self-fertile isolates of *Phytophthora infestans* in the Republic of Ireland. *Irish J. Agric. Res.* **30**: 67-69.
- Oerke, E.C. & Dehne, H.W. (1997) Global crop production and the efficacy of crop protection – current situation and future trends. *Eur. J. Plant Path.* **103**: 203-215.
- Palumbi, S.R. (2001) Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* **293**: 1786-1790.
- Parker, M.A. (1989) Disease impact and local genetic diversity in the clonal plant *Podophyllum peltatum*. *Evolution* **45**: 1209-1217.
- Parlevliet, J.E. & Van Ommeren, A. (1975) Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. II: Relationship between field trials, micro plot tests and latent period. *Euphytica* **24**: 293-303.
- Parlevliet, J.E. (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annu. Rev. Phytopathol.* **17**: 203-222.
- Parlevliet, J.E. (1993) What is durable resistance, a general outline. In: *Durability of Disease Resistance* (T. Jacobs & J.E. Parlevliet eds.), pp. 23-39. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Paul, R.E.L., Lafond, T., Müller-Graf, C.D.M., Nithiuthai, S., Brey, P.T. & Koella, J.C. (2004) Experimental evaluation of the relationship between lethal or non-lethal

- virulence and transmission success in malaria parasite infections. *BMC Evol. Biol.* **4**: 30.
- Pedersen, W.L. & Leath, S. (1988) Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**: 369-378.
- Pedley, K.F. & Martin, G.B. (2003) Molecular basis of *Pto*-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 215-243.
- Peros, J.P. & Berger, G. (2003) Genetic structure and variation in aggressiveness in European and Australian populations of the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata*. *Eur. J. Plant Pathol.* **109**: 909-919.
- Person, C. (1966) Genetic polymorphism in parasitic systems. *Nature* **212**: 266-267.
- Pilet, F. (2003) Epidémiologie et biologie adaptative des populations de *Phytophthora infestans* dans des cultures pures et hétérogènes de variétés de pomme de terre. *PhD thesis*, ENSA, Rennes, France, 157 p.
- Pilet, F., Pellé, R., Ellissèche, D. & Andrivon, D. (2005) Efficacy of the *R2* resistance gene as a component for the durable management of potato late blight in France. *Plant Pathol.* **54**: 723-732.
- Pink, D.A.C. (2002) Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* **124**: 227-236.
- Porter, L.D., Dasgupta, N. & Johnson, D.A. (2005) Effects of tuber depth and soil moisture on infection of potato tubers in soil by *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* **89**: 146-152.
- Poulin, R. & Combes, C. (1999) The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol. Today* **15**: 474-475.
- Radtke, W. & Rieckmann, W. (1991) *Maladies et Ravageurs de la Pomme de Terre*. Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer.
- Rapilly, F. (1991) *L'Epidémiologie en Pathologie végétale. Mycoses aériennes*. INRA Editions, Paris.
- Rauscher, G.M., Smart, C.D., Simko, I., Bonierbale, M., Mayton, A., Greenland, A. & Fry, W.E. (2006) Characterization and mapping of *R<sub>Pi-ber</sub>*, a novel potato late blight resistance gene from *Solanum berthaultii*. *Theor. Appl. Genet.* **112**: 674-687.
- Regoes, R., Nowak, M. & Bonhoeffer, S. (2000) Evolution of virulence in a heterogeneous host population. *Evolution* **54**: 64-71.
- Restrepo, S. & Verdier, V. (1997) Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Columbia. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4427-4434.

- Ricker, W.E. (1981) Changes in the average size and average age of Pacific salmon. *Canad. J. Fisheries and Aquatic Sci.* **38**: 1636-1656.
- Ridley, M. (1996) *Evolution*, 2<sup>nd</sup> edn. Blackwell Scientific Publication Ltd, Oxford.
- Robertson, N.F. (1991) The challenge of *Phytophthora infestans*. In: *Advances in Plant Pathology vol. 7 - Phytophthora infestans, the Cause of Late Blight of Potato* (D.S. Ingram & P.H. Williams eds.), pp. 1-30. Academic Press, London.
- Robinson, R.A. (1969) Disease resistance terminology. *Rev. Appl. Mycol.* **48**: 593-606.
- Robinson, R.A. (1973) Horizontal resistance. *Rev. Plant Pathol.* **52**: 483-501.
- Rousselle-Bourgeois, F. & Rousselle, P. (1996) Amélioration génétique. In: *La Pomme de Terre* (P. Rousselle, Y. Robert & J.C. Crosnier eds.), pp. 125-159. INRA Editions, Paris.
- Roy, B.A. (1998) Differentiating the effects of origin and frequency in reciprocal transplant experiments used to test negative frequency-dependent selection hypothesis. *Oecologia* **115**: 73-83.
- Rullich, G. & Schöber, B. (1988) Auftreten und verbreitung des A2 paarungstyps von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in der Bunderrepublik Deutschland. *Der Kartoffelbau* **39**: 244-246.
- Russell, G.E. (1978) *Plant Breeding for Pest and Disease Resistance*. Butterworths, London.
- Savary, S. & Teng, P.S. (1994) La protection des cultures dans une agriculture durable. *La Recherche* **25**: 1322-1329.
- Schafer, J.F. (1971) Tolerance to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 235-252.
- Schiff, C.L., Wilson, I.W. & Somerville, S.C. (2001) Polygenic powdery mildew disease resistance in *Arabidopsis thaliana*: quantitative trait analysis of the accession Warshau-1. *Plant Pathol.* **50**: 690-701.
- Schöber, B. & Turkensteen, L.J. (1992) Recent and future developments in potato fungal pathology. *Neth. J. Plant Pathol.* **98**(suppl. 2): 73-83.
- Shattock, R.C. (1976) Winter survival of field isolates of *Phytophthora infestans* in seed tubers and development of primarily infected plants. *Ann. Appl. Biol.* **84**: 273-274.
- Shaw, D.S., Fyfe, A. M., Hibberd, P.G. & Abdel-Sattar, M.A. (1985) Occurrence of the rare A2 mating type of *Phytophthora infestans* on imported Egyptian potatoes and the production of sexual progeny with A1 mating types from the UK. *Plant Pathol.* **34**: 552-556.
- Sheldon, A.L. (1969) Equability indices: dependence on the species count. *Ecology* **50**: 466-467.

- Shykoff, J.A. & Kaltz, O. (1998) Phenotypic changes in host plants diseased by *Microbotryum violaceum*: parasite manipulation, side effects, and trade-offs. *Int. J. Plant Sci.* **159**: 236-243.
- Sliwka, J., Jakuczun, H., Lebecka, R., Marczewski, W., Gebhardt, C. & Zimnoch-Guzowska, E. (2006) The novel major locus *Rpi-phul* for late blight resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period. *Theor. Appl. Genet.* **113**: 685-695.
- Smoot, J.J., Gough, F.J., Lamey, H.A., Eichenmuller, J.J. & Gallegly, M.E. (1958) Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **48**: 165-171.
- Soltner, D. (1999) *Les grandes Productions végétales*. Collections Sciences et Techniques agricoles, Angers.
- Song, J., Bradeen, J.M., Naess, S.K., Raasch, J.A., Wielgus, S.M., Haberlach, G.T., Liu, J., Kuang, H., Austin-Phillips, S., Buell, C.R., Helgeson, J.P. & Jiang, J. (2003) Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **100**: 9128-9133.
- Sorensen, R.E. & Minchella, D.J. (1998) Parasite influences on host life history: *Echinostoma revolutum* parasitism of *Lymnaea elodes* snails. *Oecologia* **115**: 188-195.
- Spielman, L.J., Drenth, A., Davidse, L.C., Sujkowski, L.J., Gu, W., Tooley, P.W. & Fry, W.E. (1991) A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* **40**: 422-430.
- Spire, D. & Rousselle, P. (1996) La plante. Origine socio-économique. In: *La Pomme de Terre* (P. Rousselle, Y. Robert & J.C. Crosnier eds.), pp. 25-47. INRA Editions, Paris.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. & Jones, J.D.G. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**: 661-667.
- Stewart, H.E. (1990) Effect of plant age and inoculum concentration on expression of major gene resistance to *Phytophthora infestans* in detached potato leaflets. *Mycol. Res.* **94**: 823-826.
- Stubbs, R.W. (1985) Stripe rust. In: *The Cereal Rusts. Vol II* (A.P. Roelfs & W.R. Bushnell eds.), pp. 61-101. Academic Press, London.
- Sujkowski, L.S., Goodwin, S.B., Dyer, A.T. & Fry, W.E. (1994) Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology* **84**: 201-207.

- Talboys, P.W., Garrett, C.M.E., Ainsworth, G.C., Pegg, G.F. & Wallace, E.R. (1973) A guide to the use of terms in plant pathology. *Phytopathol. Papers* **17**: 1-55.
- Taylor, J., Geiser, D., Burt, A. & Koufopanou, V. (1999) The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 126-146.
- Thakur, R.P. & Shelly, K.G. (1993) Variation in pathogenicity among single-oospore isolates of *Sclerospora graminicola*, the causal organism of downy mildew in pearl millet. *Plant Pathol.* **42**: 715-721.
- Therrien, C.D., Ritch, D.L., Sujkowski, L.S. Spielman, L.J., Fry, W.E., Daggett, S.S., Sim, J.H. & Tooley, P.W. (1993) *Phytophthora infestans* in Poland from 1987-1989; nuclear DNA content, mating type distribution and response to metalaxyl. *J. Phytopathol.* **139**: 68-80.
- Thomas, F., Adamo, S. & Moore, J. (2005) Parasite manipulation: where are we and where should we go? *Behav. Process.* **68**: 185-199.
- Thomas, S.R. & Elkinton, J.S. (2004) Pathogenicity and virulence. *J. Invertebr. Pathol.* **85**: 146-151.
- Thrall, P.H. & Burdon, J.J. (1997) Host-pathogen dynamics in a metapopulation context: the ecological and evolutionary consequences of being spatial. *J. Ecol.* **85**: 743-753.
- Thrall, P.H. & Burdon, J.J. (2002) Evolution of gene-for-gene systems in metapopulations: the effect of spatial scale of host and pathogen dispersal. *Plant Pathol.* **51**: 169-184.
- Thrall, P.H., Bever, J.D., Mihail, J.D. & Alexander, H.M. (1997) The population dynamics of annual plants and soil-borne fungal pathogens. *J. Ecol.* **85**: 313-328.
- Thrall, P.H., Burdon, J.J. & Bever, J.D. (2002) Local adaptation in the *Linum marginale* - *Melampsora lini* host - pathogen interaction. *Evolution* **56**: 1340-1351.
- Tooley, P.W. & Therrien, C.D. (1987) Cytophotometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolates of *Phytophthora infestans*. *Exp. Mycol.* **11**: 19-26.
- Turkensteen, L.J. (1978) *Phytophthora infestans*: three new hosts and specialized form causing foliar blight of *Solanum muricatum* in Peru. *Plant Dis. Report.* **62**: 829.
- Turner, S.J. & Fleming, C.C. (2002) Multiple selection of potato cyst nematode *Globodera pallida* virulence on a range of potato species. I. Serial selection on *Solanum*-hybrids. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**: 461-467.
- Van den Bosch, F. & Gilligan, C.A. (2003) Measures of durability of resistance. *Phytopathology* **93**: 616-625.



- Van der Lee, T., De Witte, I., Drenth, A., Alfonso, C. & Govers, F. (1997) AFLP linkage map of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.* **21**: 278-291.
- Van der Lee, T., Testa, A., Robold, A., Van't Klooster J. & Govers, F. (2004) High-density genetic linkage maps of *Phytophthora infestans* reveal trisomic progeny and chromosomal rearrangements. *Genetics* **167**: 1643-1661.
- Van der Plank, J.E. (1963) *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press, New York.
- Van der Plank, J.E. (1968) *Disease Resistance in Plants*. Academic Press, New York.
- Van der Plank, J.E. (1969) Pathogenic races, host resistance, and an analysis of pathogenicity. *Neth. J. Plant. Pathol.* **75**: 45-52.
- Van der Zaag, D.E. (1956) Overwintering en epidemiologie van *Phytophthora infestans*, tevens enige nieuwe bestrijdingsmogelijkheden. *Tijdschrift over Plantenziekten* **62**, 89-156.
- Van Valen, L.M. (1973) A new evolutionary law. *Evol. Theor.* **1**: 1-30.
- Vera-Cruz, C.M., Bai, J., Ona, I., Leung, H., Nelson, R.J., Mew, T.W. & Leach, J.E. (2000) Predicting durability of a disease resistance gene based on an assesment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13500-13505.
- Viel, J.F. & Richarson, S.T. (1993) Lymphoma, multiple myeloma and leukaemia among French farmers in relation to pesticide exposure. *Soc. Sci. Med.* **37**: 771-777.
- Villaréal, L.M.M.A. & Lannou, C. (2000) Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population. *Phytopathology* **90**: 1300-1306.
- Wastie, R.L. (1991) Breeding for resistance. In: *Advances in Plant Pathology, vol 7, Phytophthora infestans, the Cause of Late Blight of Potato* (D.S. Ingram & P.H. Williams eds.), pp. 193-224. Academic Press, London.
- Watson, I.A. (1958) The present status of breeding disease resistant wheats in Australia. *Agr. Gaz. N. S. Wales* **69**: 630-660.
- Watson, I.A. (1970) Changes in virulence and population shifts in plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **8**: 209-230.
- Wellings, C.R. & McIntosh, R.A. (1990) *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Australasia: pathogenic changes during the first 10 years. *Plant Pathol.* **39**: 316-325.
- White, F.F., Yang, B. & Johnson, L.B. (2000) Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 291-298.

- Wolfe, M.S. (1985) The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **23**: 251-273.
- Wolfe, M.S. (1993) Can the strategic use of disease resistant hosts protect their inherent durability? In: *Durability of Disease Resistance* (Th. Jacobs & J.E. Parlevliet eds.), pp. 83-96. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Woodham-Smith, C. (1962) *The Great Hunger, Ireland 1845-1849*. Penguin Ltd., London.
- Wright, S. (1986) *Evolution: Selected Papers*. (W.B. Provine ed.) University of Chicago Press, Chicago.
- Zeigler, R.S., Teng, P.S. & Leong, S.A. (1994) *Rice blast diseases*. CABI Biosciences, Wallingford, UK.
- Zhan, J., Mundt, C.C., Hoffer, M.E. & McDonald, B.A. (2002) Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *J. Evol. Biol.* **15**: 634-647.
- Zwankhuizen, M.J., Govers, F. & Zadocks, J.C. (1998) Development of potato late blight epidemics: disease foci, disease gradients, and infection sources. *Phytopathology* **88**: 754-763.
- Zwankhuizen, M.J., Govers, F. & Zadocks, J.C. (2000) Inoculum sources and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in Southern Flevoland, the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**: 667-680.

**Nombre total de références bibliographiques : 278**



## *Annexe I*

**Andrivon D., Pilet F., Montarry J., Hafidi M., Corbière R., Achbani E.H., Pellé R. & Ellissèche D. 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* in press.**

# Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations

Didier Andrivon<sup>1</sup>, Fabian Pilet<sup>1,5</sup>, Josselin Montarry<sup>1</sup>, Majida Hafidi<sup>2,3</sup>, Roselyne Corbière<sup>1</sup>, El Hassan Achbani<sup>3</sup>, Roland Pellé<sup>4</sup> and Daniel Ellissèche<sup>4</sup>

<sup>1</sup> UMR INRA-ENSAR BiO3P, BP 35327, F- 35653 Le Rheu Cedex, France

<sup>2</sup> Faculté des Sciences et Techniques de Fès-Saïs, Route d'Immouzer, Fès, Morocco

<sup>3</sup> Laboratoire de Phytobactériologie, INRA Centre Régional Saïs-Moyen Atlas, BP 578, 50000 Meknès, Morocco

<sup>4</sup> UMR INRA-ENSAR APBV, Keraiber, F-29260 Ploudaniel, France

<sup>5</sup> Present address: CIRAD-CP, OPRI, P.O. Box 245, Sekondi, Ghana

---

## Abstract

Andrivon, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E.H., Pellé, R. and Ellissèche, D. 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* in press.

The use of partially resistant cultivars should become an essential component of a sustainable management strategy of potato late blight, caused by *Phytophthora infestans*. It is therefore important to determine to what extent *P. infestans* populations can be selected for increased aggressiveness by potato cultivars with different levels of partial resistance. To this end, we sampled *P. infestans* populations from France and Morocco, chosen as locations where late blight occurs regularly but which differ in the distribution of potato cultivars. Cross-inoculation experiments were used to determine the aggressiveness of all populations to potato cultivars Bintje (prevalent in France but not grown in Morocco) and Désirée

(popular in Morocco but cultivated to a very small extent in France). French populations were more aggressive on Bintje than on Désirée, irrespective of the site they were sampled from. Their aggressiveness increased between early and late samplings, suggesting that both cultivars selected for increased aggressiveness during epidemics. By contrast, Moroccan populations were more aggressive on Désirée, regarded as partially resistant in Europe, than on Bintje, highly susceptible under European conditions. These data indicate that *P. infestans* populations adapt to locally dominant cultivars, irrespective of their resistance levels, and can therefore overcome polygenic, partial resistance. This adaptive pattern may render partial resistance non durable if not properly managed.

*Additional keywords:* adaptation, durability, pathogenicity, resistance erosion, *Solanum tuberosum*

---

Late blight, caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, is the most destructive disease of potato (*Solanum tuberosum* L.) worldwide. It recently re-emerged as an important disease in many countries (11), increasing the need for effective and durable control strategies. While late blight control currently relies heavily on pesticide applications, both in developed and developing countries, the sustainability of this approach is highly questionable, both because

isolates resistant to systemic fungicides appear rapidly wherever these products are used (16), and because sustainable, organic and subsistence agriculture require low or no synthetic inputs and have to rely on renewable means of control.

Genetic resistance to late blight is available in a wide range of genetic resources (20, 35, 36, 41), but has shown limitations for effective or durable control of late blight. *P. infestans* is a highly variable pathogen,

especially for virulence, making race-specific resistance genes almost useless for durable disease control in the field (31, 41). Polygenic partial resistance may contribute to disease control, but breeding cultivars with sufficient resistance is difficult and cumbersome. Furthermore, the durability of partial resistance, often postulated from its polygenic inheritance, remains to be ascertained. Several reports provided evidence for isolate specificity in the response of several partially resistant cultivars in controlled inoculation experiments (5, 6, 8, 9, 22). These suggest that adaptation for aggressiveness (*ie*, quantitative components of pathogenicity; 2, 37) can take place in *P. infestans* populations, and result in the progressive erosion of partial resistance. However, since part of this isolate specificity might be due to environment heterogeneity (26), and since other workers did not observe isolate specificity or preferential adaptation (21), the question of the extent and conditions in which adaptation to partial resistance can occur remains open.

From an evolutionary standpoint, answering this question equates to investigating whether *P. infestans* populations show general adaptation (*i.e.* adapt to the prevailing resource), local adaptation to individual niches (in this case, different cultivars), or local maladaptation (*i.e.*, higher pathogenicity on cultivars not present locally). This key issue in host-parasite co-evolution has been much debated recently in several pathosystems (15, 24, 25). Theoretical models show that general adaptation and local adaptation or maladaptation can occur, depending on the extent of relative gene flow (migration) in the host and pathogen, mutation rates, recombination, population size and generation time (1, 12-14). Unfortunately, these parameters are poorly quantified in many host-parasite systems, and their relative importance is likely to differ from site to site; for instance, in *P. infestans*, the amount of recombination is probably very different in populations dominated by one of the two mating types than in populations where both mating types are present at almost equal frequencies. Experimental evidence is thus needed to validate theoretical expectations in populations with different life histories. Recent work on French *P. infestans* populations sampled from cultivars with various types and levels of resistance showed that the susceptible

cultivar Bintje hosted a more aggressive population than the partially resistant cultivar Désirée, without differential adaptation to these two cultivars for aggressiveness (30). Because Désirée is rarely grown in France and Bintje is one of the prevailing cultivars there, this finding could reveal general adaptation rather than an effect of cultivar resistance levels.

The present study is based on aggressiveness measurements on the same two potato cultivars (Bintje and Désirée) of *P. infestans* populations collected in France and in Morocco, chosen to represent contrasting situations in terms of cultivar distributions (and hence of selection pressures). In both countries, late blight is a major constraint for potato cropping (7, 33). Potato acreage in Morocco ranges from 50,000 to 60,000 ha annually; potatoes are grown in coastal areas during the autumn and winter for export, and inland during the spring and autumn for local fresh market consumption (19). Late blight severity fluctuates from year to year depending on climatic conditions, but also depends on host susceptibility and pathogen genetic diversity. In the coastal areas, the main cultivar is Nicola, while inland production areas are grown primarily to cultivars Désirée and to a lesser extent Spunta. The first population surveys of *P. infestans* in Morocco have only recently been performed. A national survey in 1996-1998 revealed the occurrence of a limited number of genotypes, although the presence of both mating types was ascertained (33). A more focused investigation over two years (1999-2000 and 2000-2001) in two areas of potato cropping, the northern plain around Larache and the Middle Atlas area around Meknès, showed a clear regional structure: populations from Larache consisted mainly of isolates belonging to the A1 mating type and to complex pathotypes (5.5 virulence factors per isolate on average), whereas populations from Meknès predominantly included A2 isolates belonging to simple pathotypes (2.85 virulence factors per isolate; 17). In France, potato is grown mainly in the northern half of the country, where late blight is often a problem, as shown by the 12-18 annual sprays applied to commercial crops to combat the disease (32). The surveys done in the 1990s and early 2000s indicate that the French *P. infestans* populations almost exclusively consist of A1

isolates belonging to rather complex races (3, 4, 28, 30).

The aims of the present study were thus to determine whether populations of *P. infestans* were more aggressive i) in locations with a long term cultivation of partially resistant potato cultivars than in locations with long-term cultivation of susceptible cultivars, and ii) at the end than at the start of epidemics.

## Material and Methods

**Isolate collection and isolation.** In France, isolates were collected in the spring of 1999 from cultivars Bintje and Désirée grown at two locations in Brittany (Le Rheu – 48°01' N, 1°43' W; Ploudaniel – 48°30' N, 4°19' W). At both locations and for both cultivars, two series of isolates were collected: the first sampling was one week after the first symptoms were observed in the field, and the second sampling was 2-3 weeks later. In Morocco, infected leaf samples were collected from potato crops in farmers' fields in the autumns of 1999 and 2000 in the area of Meknès (33°54' N, 05°33' W), and in the winters of 1999-2000 and 2000-2001 around Larache (35°11' N, 06° 09' W). In each site, the collection area included several fields in a 15-20 km radius. Infected material was taken from 1-5 plants per field, and brought back to the laboratory for isolation. Unlike in France, the identity of cultivars from which the samples were taken could not be systematically ascertained; however, the foliage and tuber characteristics of the crops sampled leave little doubt that almost all isolates from Meknès came from Désirée, while most isolates from Larache came from Nicola.

In both countries, single lesion isolates were established as described by Lebreton and Andrivon (27). Briefly, small portions (0.25 - 1 cm<sup>2</sup>) of diseased tissue were excised from the margin of active lesions, deposited on slices of susceptible potato tubers, and incubated in a humid chamber for 8-10 days. Mycelium growing on the surface of the tuber slices was then aseptically transferred to pea agar containing 80 mg.l<sup>-1</sup> nystatin and 160 mg.l<sup>-1</sup> ampicillin. Cultures were subsequently maintained on pea agar at 15-18 °C. Overall, 63 Moroccan isolates from 29 different fields (11 isolates from 8 fields in Meknès, 1999; 12 isolates from 5 fields in Larache, 1999; 21

isolates from 9 fields in Meknès, 2000 and 19 isolates from 7 fields in Larache, 2000), and 57 French isolates (18 from Bintje in Le Rheu, 9 from Désirée in Le Rheu, 16 from Bintje in Ploudaniel and 14 from Désirée in Ploudaniel) were used in the experiments.

**Aggressiveness tests.** Tests were performed on leaves of cultivars Bintje and Désirée, detached from plants grown in the glasshouse for 6-8 wks. Désirée is a red-skin cultivar, which has been popular in Mediterranean regions for at least a decade, but is not widely grown (except for seed production destined to export) in Western Europe where it displays a moderate level of partial resistance to late blight in the field (source: European Potato Database, <http://www.europotato.org>). Bintje is a yellow-skin cultivar, widely grown in continental Western Europe where it is highly susceptible to late blight (source: European Potato Database, <http://www.europotato.org>), but is not grown to any extent in Morocco. Nicola, from which the blight samples from Larache presumably originated, is a yellow-skin, early cultivar rated as moderately susceptible in Europe (source: European Potato Database, <http://www.europotato.org>).

The inoculation protocol was previously described (29). Leaves were detached from the plants (5<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup> node from the base) just prior to inoculation. They were placed abaxial face up on moist filter paper in large clear plastic boxes, with a wet cotton bud on the petiole to maintain sufficient turgidity in the leaf tissue throughout the experiments.

Sporangial suspensions of the isolates were prepared by gently scraping the surface of 2 week-old cultures on pea agar after flooding with 5 ml sterile water. The concentration of the suspensions was adjusted to 5.10<sup>4</sup> sporangia.ml<sup>-1</sup> with a haemocytometer. For each isolate, a 20 µl drop of spore suspension was deposited on each of the five leaflets of two complete leaves per cultivar. Inoculated leaves were incubated for 7 days in a climate chamber under a 16 h dark/8 h light photoperiod with respective temperatures of 15 °C and 18 °C. Disease severity was recorded on each inoculated leaflet 7 days after inoculation, through the measurement of lesion diameters on two orthogonal directions (L<sub>1</sub> for width and L<sub>2</sub> for length). Spore production on each leaflet was assessed by collecting the

spores in 5 ml sterile water and measuring the concentration of the resulting suspension with a haemocytometer.

For practical reasons, tests were performed as a series of batches, each including 10-15 isolates from the same origin. Isolates from Ploudaniel were tested in the summer of 2000, while isolates from Le Rheu and Morocco were tested in the summer of 2001. All tests were performed in the same facilities.

**Data collection and analysis.** Two aggressiveness components were assessed 7 days after inoculation: lesion size (calculated as  $LS = (\pi \cdot L_1 \cdot L_2)/4$ , *i.e.* assuming the lesion was elliptic), and spore production (SP) was assessed as the total number of spores produced per leaflet. Although statistically significant due to the large number of observations in the data set, the linear correlation between both variables proved weak ( $r^2=0.207$ ), suggesting that LS and SP are largely independent components of aggressiveness.

Since our experimental design was not intended to directly compare the aggressiveness of French and Moroccan isolates, data were analysed separately for France and Morocco, and 'site' effects were included within countries. Data for each aggressiveness variable (LS and SP) were submitted to analyses of variance (ANOVA) using the GLM procedure of the SAS statistical software, v. 8.1 (SAS Institute, Cary, NC). Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnoff tests showed that data sets had non-normal distributions due to longer tails than expected for a strictly normal distribution. Transforming the data reduced the deviation of residues from normality, but did not suppress it. The statistical effects of variables generated by the ANOVA on transformed and non-transformed data were similar, although the significance levels varied. An ANOVA performed on the ranks rather than on the aggressiveness variables (suggested to be a more robust method) also yielded the same results. We take this as evidence that the effects of test cultivars, sites and sampling dates/years were strong enough to be detected in all cases, and to suggest that the slight deviations of the distributions of residuals from normality in our data sets did not skew ANOVA comparisons of effects to any marked extent. Whenever significant effects were detected, means were

compared using the Student-Newman & Keuls (SNK) test ( $\alpha=0.05$ ).

## Results

**Selection for aggressiveness according to cultivar use.** ANOVA revealed significant effects of test-cultivar on lesion size (LS) and spore production (SP) in French populations, and on SP in Moroccan populations (Tables 1 and 2). The comparison of means indicated that French populations produced significantly larger lesions and higher numbers of sporangia on leaflets of cultivar Bintje (the prevalent cultivar in France) than on leaflets of cultivar Désirée, whereas Moroccan populations produced slightly larger lesions (7.22 vs 6.88 cm<sup>2</sup>;  $P = 0.069$ ) and significantly more sporangia on leaflets of cultivar Désirée (the prevalent cultivar in Morocco) than on leaflets of cultivar Bintje (Fig. 1). Site\*test-cultivar and sampling-date\*test-cultivar interactions were not significant for the French populations (Table 1), indicating that French populations were more aggressive on Bintje than on Désirée in both sites and at both sampling dates. The site\*test-cultivar and year\*test-cultivar interactions were not significant for SP in Moroccan populations (Table 2), so Moroccan populations were more aggressive on Désirée than on Bintje in both sites and in each of the two years.

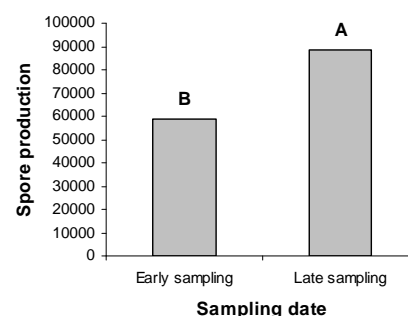
**TABLE 1.** ANOVA analysis for lesion size (LS) and spore production (SP) in French populations of *Phytophthora infestans* collected in two sites (Le Rheu and Ploudaniel) in 1999 at two different sampling date. Sources of variation are the site effect, the test cultivar effect, the sampling date effect and all two-way interactions between these variables. The statistically significant effects are indicated by stars (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  and \*\*\*  $p<0.001$ ).

| Source                      | LS      |            | SP      |            |
|-----------------------------|---------|------------|---------|------------|
|                             | F value | Pr>F       | F value | Pr>F       |
| Site                        | 181.59  | <.0001 *** | 19.63   | <.0001 *** |
| Test-cultivar               | 89.14   | <.0001 *** | 94.68   | <.0001 *** |
| Site*Test-cultivar          | 0.67    | 0.4142     | 0.60    | 0.4401     |
| Sampling-date               | 0.31    | 0.5758     | 20.50   | <.0001 *** |
| Sampling-date*Site          | 0.36    | 0.5474     | 0.05    | 0.8245     |
| Sampling-date*Test-cultivar | 3.42    | 0.0648     | 2.87    | 0.0906     |

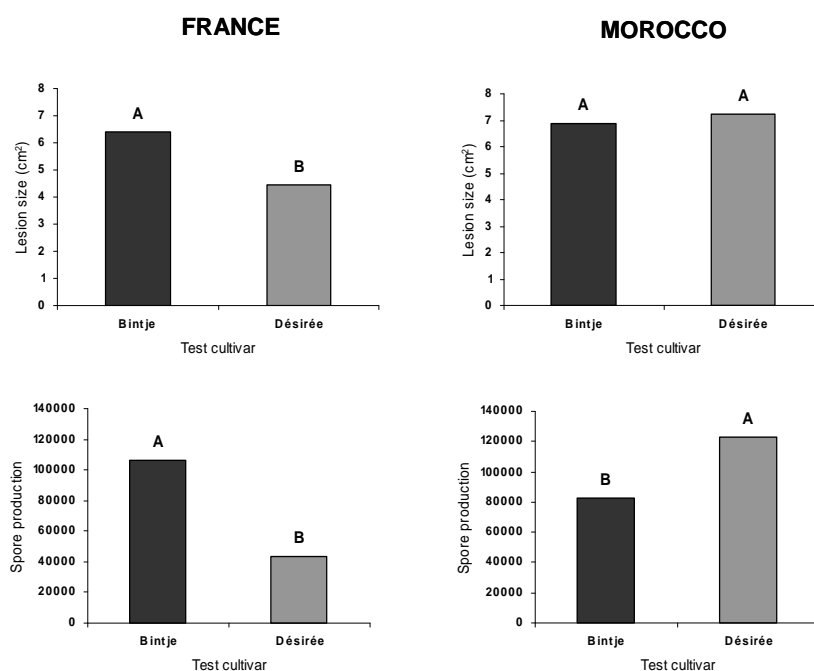


**TABLE 2.** ANOVA analysis for lesion size (LS) and spore production (SP) in Moroccan populations of *Phytophthora infestans* collected in two sites (Larache and Meknès) in two consecutive cropping seasons (1999-2000 and 2000-2001). Sources of variation are the site effect, the test cultivar effect, the year effect and all two-way interactions between these variables. The statistically significant effects are indicated by stars (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

| Source             | LS      |            | SP      |            |
|--------------------|---------|------------|---------|------------|
|                    | F value | Pr>F       | F value | Pr>F       |
| Site               | 16.98   | <.0001 *** | 25.13   | <.0001 *** |
| Test-cultivar      | 3.30    | 0.0696     | 12.27   | 0.0005 *** |
| Site*Test-cultivar | 4.80    | 0.0288 *   | 0.17    | 0.6763     |
| Year               | 33.39   | <.0001 *** | 24.04   | <.0001 *** |
| Year*Site          | 7.62    | 0.0059 **  | 0.16    | 0.6884     |
| Year*Test-cultivar | 6.12    | 0.0136 *   | 0.01    | 0.9170     |



**Fig. 2.** Number of sporangia produced per leaflet by *Phytophthora infestans* isolates collected in France in 1999, according to sampling dates. The early sampling was one week after the first appearance of symptoms in the field; the late sampling was three weeks later. Different characters above bars represent the homogenous groups identified (SNK test,  $\alpha = 0.05$ ).



**Fig. 1.** Lesion sizes and number of sporangia produced per leaflet on potato cultivars Bintje and Désirée by *Phytophthora infestans* isolates collected in France and in Morocco. Different characters above bars represent the homogenous groups identified (SNK test,  $\alpha = 0.05$ ).

**Selection for aggressiveness during the epidemic.** ANOVA on French data revealed a significant effect of sampling date on spore production (Table 1). The means comparison indicated that isolates collected at the start of the epidemic were less aggressive than those sampled at the end of the epidemic (Fig. 2). This result was true in both French sites (no interaction between sampling-date and site)

and on the two test cultivars (no interaction between sampling-date and test-cultivar).

**Aggressiveness according to sample origin.** In both French and Moroccan populations, a highly significant site effect on aggressiveness components was detected in the ANOVA (Tables 1 and 2). The lack of statistically significant interactions between

sites and all other main factors indicates that the adaptive pattern to locally dominant cultivars was independent of the mean aggressiveness levels of local populations (high in Ploudaniel and Larache, low in Le Rheu and Meknes).

In France, populations collected from the susceptible cultivar (Bintje) proved the most aggressive on both test cultivars Bintje and Désirée (data are not shown), suggesting that differential adaptation of *P. infestans* populations to cultivars did not occur. This is consistent with a previous report using the same two cultivars (30).

### Discussion

The data from aggressiveness measurements in both French and Moroccan *P. infestans* populations are consistent with the hypothesis that these populations are adapted to the locally dominant resources (in this case, cultivars), irrespective of the resistance characteristics of these cultivars. Although the results concerning the adaptation of Moroccan populations to the partially resistant cultivar Désirée seem at first glance to contradict previous reports from US populations showing no evidence for erosion of partial resistance (21), this contradiction is only apparent, since the partially resistant cultivars included in the experiments had not been grown to any large extent in the USA at the time of the study. However, the pattern of general adaptation observed in both France and Morocco is not consistent with theoretical expectations based on local life histories of the pathogen in either country. Indeed, in France, pathogen populations are clonal (only one mating type present), but not geographically structured (28), which suggests extensive gene flow occurring through migration; conversely, in Morocco, populations are geographically structured and both mating types are present (17, 33), which may indicate local recombination but limited gene flow between areas. The fact that in all cases, adaptation to locally dominant cultivars was observed points to a prevailing influence of selection over other life history traits in shaping *P. infestans* populations, probably a consequence of the almost obligate biotrophic status of the pathogen.

Very few data exist regarding the pathogenicity characteristics of Moroccan populations of *P. infestans*. Hammi *et al.* (18) investigated the aggressiveness of seven isolates from tomato and 92 isolates from potato on detached leaflets of four potato cvs. (Désirée, Nicola, Spunta and Kondor) and of one tomato cv. (Daniela). Unfortunately, their paper only reports on the range of variation observed within and among the two groups of isolates on each host species, but does not provide any quantitative indication regarding differences between isolates on each potato cultivar. Our data clearly demonstrate i) that Moroccan *P. infestans* populations are adapted to a partially resistant cultivar (Désirée) and ii) that the variation for aggressiveness shows a regional structure that was also detected using virulence or other biological markers (mating type, metalaxyl sensitivity; 17).

In our tests, cultivar Désirée was more susceptible to Moroccan isolates of *P. infestans* than cultivar Bintje, regardless of the aggressiveness component considered. While this was more obvious for spore production than for lesion size, for which the probability associated with the F test (0.069) was marginally significant, the trend was consistent for both aggressiveness variables. This result is consistent with the fact that cultivar Désirée is used extensively in Morocco (and more generally in northern Africa), whereas cultivar Bintje is not grown to any extent in this part of the world. It was, however, surprising at first, because i) the relative susceptibility to late blight of these two cultivars in western Europe, where they were bred, is exactly the opposite and ii) no strong genotype\*environment interactions have been detected in a previous multilocal, multi-year trial involving other sources of partial resistance to late blight (10). The high susceptibility of cultivar Désirée in Morocco might thus be diagnostic of the erosion of the partial resistance of this cultivar, through adaptation to increased aggressiveness in local populations of the pathogen. Since the aggressiveness of French and Moroccan populations of *P. infestans* on cv. Bintje was comparable, the change in relative susceptibility between the two cultivars strongly suggests that adaptation to cultivar Désirée in Moroccan populations was the result of selection of isolates with increased aggressiveness specifically to this cultivar, rather than a consequence of selection for

higher aggressiveness to all potato cultivars. It would be very worthwhile to confirm this hypothesis by testing in the field the relative susceptibility of a range of potato cultivars in Morocco and comparing it to that in other parts of the world.

The large statistical effect of geographical origin of isolates within countries on aggressiveness variables strongly suggests that the geographical structure previously observed in Moroccan populations of *P. infestans* could be related – at least in part - to pathogenicity. This hypothesis is consistent with the fact that races found in Larache, which showed the highest aggressiveness to potato, had complex virulence combinations, whereas the less aggressive isolates from Meknès belonged to simple races (17). Overall, isolates from Larache appear to be much specialised to potato, whereas isolates from Meknès might be more polyphagous, with a better ability to switch hosts between potato and tomato. This hypothesis is supported by the fact that most isolates from Meknès belonged to the A2 mating type, which was found to occur at higher frequencies on tomato than on potato in that area (18), but not in other places and years (33). The current situation in Meknès is reminiscent to the population structure observed in France (27, 29).

The aggressiveness of the two French populations of *P. infestans* increased between the two dates of sampling, independently of the host genetic background. A similar result was observed by in a population of *Blumeria graminis tritici* (39). This change in mean aggressiveness during the course of the epidemic shows that a selection for the isolates most aggressive exists. On a long-term basis, this selection could affect the durability of partial resistance, and might explain the progressive decrease in the resistance of partially resistant cultivars, such as Charlotte in western Europe (F. Pilet and D. Andrivon, unpublished data; D. Michelante, pers. comm.). However, partial resistance is usually long lasting, including in potato (38). If selection for aggressiveness is strong, the durability of this type of resistance supposes a strong counter-selection of the most aggressive isolates between two cropping seasons of production. One possible explanation for the counter-selection of highly aggressive isolates is related to the detrimental effect of increased pathogenicity on the persistence of host organs

(such as tubers) the pathogen survives on. It has been argued that aggressive *P. infestans* strains which cause extensive rot in susceptible potato seed tubers may not survive the winter period, thus leading to a negative selection pressure upon aggressive strains of the pathogen (23, 34, 40). Another possibility, which has not been thoroughly tested experimentally so far, is that aggressiveness is determined in part by epigenetic factors, allowing some degree of phenotypic plasticity within isolates. In any case, the observation that isolates/lineages of the pathogen with low or medium aggressiveness persist in the population collected in Ploudaniel supports the view that higher aggressiveness is not the only determinant of long-term fitness in *P. infestans* populations.

### Acknowledgements

The authors thank Naïma Lamaaraf and Laaziz Erroufi for their help in the isolation and maintenance of Moroccan *P. infestans* isolates, and Bensalem Kouta (Plant Protection Service, Meknès) for assistance in organising the sampling in Meknès and Larache. We are also grateful to Marie Gosme for useful advice with the statistics and to the two anonymous referees for valuable comments. Financial support from the Programme de Recherche Agronomique pour le Développement (PRAD), co funded by the French Ministry of Foreign Affairs and Moroccan Ministry of Agriculture, is gratefully acknowledged. Fabian Pilet was supported by a PhD grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

### Literature cited

1. Alleaume-Benharira, M., Pen, I.R. and Ronce, O. 2006. Geographical patterns of adaptation within a species' range: interactions between drift and gene flow. *J. Evol. Biol.* 19:203-215.
2. Andrivon, D. 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* 83:889-890.
3. Andrivon, D. 1994. Races of *Phytophthora infestans* in France, 1991-1993. *Potato Res.* 37:279-286.

4. Andrivon, D., Béasse, C. and Laurent, C. 1994. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* collected in northwestern France from 1988 to 1992. *Plant Pathol.* 43:471-478.
5. Bjor, T. and Mulelid, K. 1991. Differential resistance to tuber late blight in potato cultivars without R-genes. *Potato Res.* 34:3-8.
6. Caten, C. E. 1974. Intra-racial variation in *Phytophthora infestans* and adaptation to field resistance for potato blight. *Ann. Appl. Biol.* 77:259-270.
7. Duvauchelle, S. and Andrivon, D. 1996. Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans*. Pages 283-291 in : La Pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J.C., eds. INRA Editions, Paris.
8. Flier, W.G., Turkensteen, L.J., vandenBosch, G.B.M., Vereijken, P.F.G. and Mulder, A. 2001. Differential interaction of *Phytophthora infestans* on tubers of potato cultivars with different levels of blight resistance. *Plant Pathol.* 50:292-301.
9. Flier, W.G., van den Bosch, G.B.M. and Turkensteen, L.J. 2003. Stability of partial resistance in potato cultivars exposed to aggressive strains of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 52:326-337.
10. Forbes, G.A., Chacón, M.G., Kirk, H.G., Huarte, M.A., Van Damme, M., Distel, S., Mackay, G.R., Stewart, H.E., Lowe, R., Duncan, J.M., Mayton, H.S., Fry, W.E., Andrivon, D., Ellissèche, D., Pellé, R., Platt, H.W., MacKenzie, G., Tarn, T.R., Colon, L.T., Budding, D.J., Lozoya-Saldaña, H., Hernandez-Vilchis, A. and Capezio, S. 2005. Stability of resistance to *Phytophthora infestans* in potato: an international evaluation. *Plant Pathol.* 54:364-372.
11. Fry, W.E. and Goodwin, S.B. 1997. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Dis.* 81:1349-1357.
12. Gandon, S., Capowiez, Y., Dubois, Y., Michalakakis, Y. and Olivieri, I. 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proc. Royal Soc. London B* 263:1003-1009.
13. Gandon, S., Ebert, D., Olivieri, I. and Michalakakis, Y. 1998. Differential adaptation in spatially heterogeneous environments and host-parasite coevolution. Pages 325-340 in: Genetic structure and local adaptation in natural insect populations. Mopper, S. and Strauss, S., eds. Chapman & Hall, London.
14. Gandon, S. and Michalakakis, Y. 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *J. Evol. Biol.* 15:451-462.
15. Gandon, S. and van Zandt, P.A. 1998. Local adaptation and host-parasite interactions. *Trends Ecol. Evol.* 13:214-216.
16. Gisi, U. and Cohen, Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:549-572.
17. Hafidi, M., Achbani, E.H., Lamaaraf, N., Bouami, F., Andrivon, D. and Corbière R., 2002. Geographic differentiation of populations of *Phytophthora infestans* in Morocco. *Al Awamia* 104:96.
18. Hammi, A., Msatef, Y., Bennani, A., Ismaili, A.E.L. and Serrheni, M.N. 2002. Mating type, metalaxyl resistance and aggressiveness of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Morocco. *J. Phytopathol.* 150:289-291.
19. Hanafi, A. 1999. Potato production in Morocco. World Potato Congress Article of the Month, July 1999 (online at <http://www.potatocongress.org>).
20. Hawkes, J.G. 1958. Significance of wild species and primitive forms for potato breeding. *Euphytica* 7:257-270.
21. James, R.V. and Fry, W.E. 1983. Potential for *Phytophthora infestans* populations to adapt to potato cultivars with rate-reducing resistance. *Phytopathology* 73:984-988.
22. Jeffrey, S.I.B., Jinks, J.L. and Grindle, M. 1962. Intraracial variation in *Phytophthora infestans* and field resistance to potato blight. *Genetica* 32:323-338.
23. Kadish, D. and Cohen, Y. 1992. Overseasoning of metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers. *Phytopathology* 82:887-889.
24. Kaltz, O. and Shykoff, J.A. 1998. Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity* 81:361-370.

25. Kawecki, T.J., and Ebert, D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7:1225-1241.
26. Kulkarni, R.N. and Chopra, V.L. 1982. Environment as the cause of differential interaction between host cultivars and pathogenic races. *Phytopathology* 72:1384-1386.
27. Lebreton, L. and Andrivon, D. 1998. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:583-594.
28. Lebreton, L., Laurent, C. and Andrivon, D. 1998. Evolution of *Phytophthora infestans* populations in the two most important potato production areas in France during 1992-1996. *Plant Pathol.* 47:427-439.
29. Lebreton, L., Lucas, J.M. and Andrivon, D. 1999. Aggressiveness and competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato and tomato in France. *Phytopathology* 89:679-685.
30. Montarry, J., Corbière, R., Lesueur, S., Glais, I. and Andrivon, D. 2006. Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *J. Evol. Biol.* 19:522-531.
31. Pilet, F., Pellé, R., Ellissèche, D. and Andrivon, D. 2005. Efficacy of the R2 resistance gene as a component of durable management of potato late blight in France. *Plant Pathol.* 54:723-732.
32. Schepers, H.T.A.M. 2003. The development and control of *Phytophthora infestans* in Europe in 2002. *Proc. 7th Workshop European Network for Development of an Integrated Control Strategy of potato late blight*, PAV Special Report 9 (Westerdijk, C.E. and Schepers, H.T.A.M., eds). 9-22.
33. Sedegui, M., Carroll, R.B., Morehart, A.L., Evans, T.A., Kim, S.H., Lakhdar, R. and Arifi, A. 2000. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. *Plant Dis.* 84:173-176.
34. Shattock, R.C. 1976. Winter survival of field isolates of *Phytophthora infestans* in seed tubers and development of primarily infected plants. *Ann. Appl. Biol.* 84:273-274.
35. Simko, I. 2002. Comparative analysis of quantitative trait loci for foliage resistance to *Phytophthora infestans* in tuber-bearing *Solanum* species. *Am. J. Potato Res.* 79:125-132.
36. Spooner, D.M. and Bamberg, J.B. 1994. Potato genetic resources: sources of resistance and systematics. *Am. Potato J.* 71:325-337.
37. Vanderplank, J.E. 1968. Disease resistance in plants. Academic Press, New York.
38. Van der Plank, J.E., 1971. Stability of resistance to *Phytophthora infestans* in cultivars without R genes. *Potato Res.* 14:263-270.
39. Villareal, L.M.M.A. and Lannou, C. 2000. Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population. *Phytopathology* 90:1300-1306.
40. Walker, A.S.L. and Cooke, L.R. 1990. The survival of *Phytophthora infestans* in potato tubers – the influence of phenylamide resistance. *Brighton Crop Prot. Conf. – Pests and Dis.* 1990:1109-1114.
41. Wastie, R.L. 1991. Breeding for resistance. Pages 193-224 in: *Phytophthora infestans: the cause of late blight of potato*. Ingram, D. S. and Williams, P. H., eds. Academic Press, San Diego, CA.

## *Annexe II*

**Montarry J., Corbière R., Glais I. & Andrivon D. 2006. Les souches A2 de l'agent du mildiou *Phytophthora infestans* sont plus « récentes » en France que les A1... Mais sont-elles plus agressives ? *Phytoma – La Défense des Végétaux* 599 : 28- 30.**



ph. D.R.

# dossier

## Mildiou de la pomme de terre des populations qui changent

**Les souches A2 de l'agent du mildiou *Phytophthora infestans* sont plus « récentes » en France que les A1... Mais sont-elles plus agressives ?**

Josselin Montarry\*, Roselyne Corbière\*, Isabelle Glais\* et Didier Andrivon\*

**L'irrésistible ascension des souches A2, un scénario catastrophe pour la pomme de terre ? Sûrement pas pour cause d'agressivité de ces souches ! Expliquons-nous : les souches A2 sont des souches de *Phytophthora infestans* (l'agent du mildiou de la pomme de terre) dont la fréquence augmente nettement en France. On craignait qu'elles soient en elles-mêmes plus agressives, plus pathogènes, que nos « bonnes vieilles » souches A1. Nous verrons que ce n'est pas le cas, et comment on l'a prouvé. Ceci dit, même si elles ne sont pas plus pathogènes (voire moins) à elles seules, l'arrivée des souches A2 peut inquiéter. Car, quand les deux souches sont présentes dans une population, elles peuvent se croiser. Et ce n'est pas sans conséquences, on va rappeler lesquelles.**

Jusqu'au début des années 1980, les populations européennes de *P. infestans* ne renfermaient que des souches appartenant au type sexuel A1, le type A2 n'étant présent qu'au Mexique, centre d'origine vraisemblable de la maladie (Niederhauser, 1991 ; Andrivon, 1996). En Europe, le type A2 a été mis en évidence en Suisse en 1981 (Hohl & Iselin, 1984). Il a ensuite été identifié dans divers pays du nord de l'Europe : Pays-Bas (Frinking *et al.*, 1987), Suède (Kadir & Umareus, 1987), Allemagne (Rullich & Schöber, 1988), Grande-Bretagne (O'Sullivan et Dowley, 1991), Pologne (Therrien *et al.*, 1993), Norvège (Hermansen *et al.*, 2000)...

Il y a aujourd'hui environ 50 % de souches A1 et 50 % de souches A2 dans l'ensemble des pays du nord-est de l'Europe ([www.eucablight.org](http://www.eucablight.org)).

### Développement des souches de type sexuel A2 en France

En France, quelques rares souches A2 ont été détectées en 1997 et 1998, essentiellement sur tomate dans des jardins privés (Lebreton *et al.*, 1998). La surveillance s'est poursuivie et toutes les souches testées en 1999, 2000 et 2001 se sont révélées appartenir au type sexuel A1 (Détourné *et al.*, 2004). Depuis 2002-2003, une très faible proportion de souches A2 est détectée presque tous les ans en Bretagne (4 en 2002, 1 en 2004 et 1 en 2005, pour environ 100 échantillons analysés par an). Mais la fréquence de ces souches ne cesse de croître dans le Nord de la France : 7 % en 2003, 20 % en 2004 et 37 % en 2005 (Dubois et Duvauchelle, 2005).

### Une idée reçue à tester

L'augmentation en fréquence des souches de type sexuel A2 fait peur, et nous entendons de plus en plus souvent dire que les souches A2 sont bien plus agressives que les souches A1. Or, le type sexuel est déterminé par un seul

gène (Judelson *et al.*, 1995), n'ayant *a priori* aucune conséquence fonctionnelle sur le pouvoir pathogène ; rien n'indique alors que les souches A2 soient différentes des souches A1 en terme d'agressivité. Nous avons donc comparé l'agressivité de deux lots de souches (38 souches A2 et 43 souches A1), collectées en 2004 et 2005 dans plusieurs parcelles de la région Nord-Pas-de-Calais (Tableau 1).

Pour limiter les biais d'échantillonnage, les souches incluses dans cette comparaison viennent de parcelles cultivées avec la variété sensible Bintje et où les deux types sexuels cohabitaient. Les tests de pouvoir pathogène ont tous été réalisés sur cette variété.

### Résultats

Une analyse de variance, réalisée en utilisant la procédure GLM (General Linear Model) du logiciel SAS (Statistical Analysis System, Institute Inc., Cary, NC), montre l'existence d'une différence d'agressivité entre les deux groupes de souches au seuil de significativité de 5 %. En revanche, ni l'effet année ni l'interaction entre année et type sexuel ne sont significatifs (Tableau 2), ce qui montre une stabilité du comportement des populations échantillonnées lors des deux années par rapport au pouvoir pathogène des deux types de souches.

Malgré la faible différence apparente des valeurs de l'indice d'agressivité (13,97 pour les souches A1 contre 13,83 pour les souches A2), le test statistique de comparaison des moyennes de Student-Newman-Keuls au seuil de 5 % montre que cet écart est significatif, et donc...

... que les souches du type sexuel A1 sont significativement plus agressives que celles du type sexuel A2 (Figure 2 p. 30) !

Il est important de remarquer que l'indice d'agressivité utilisé est de nature logarithmique : de faibles différences de valeur de cet indice peuvent donc s'avérer tout à fait significatives sur l'une ou l'autre des composantes. Un examen plus approfondi des données brutes montre d'ailleurs que la composante

\* INRA, Agrocampus-Rennes. UMR 1999 BiO3P, 35653 Le Rheu.

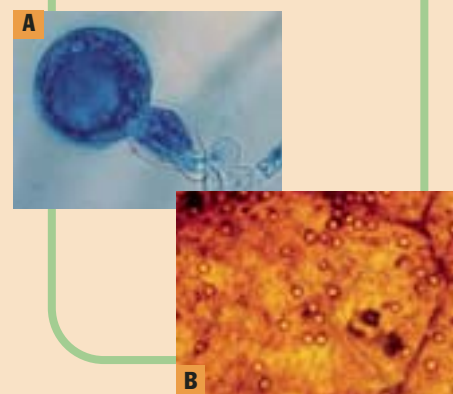
## 1 - La reproduction de *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou de la pomme de terre

*Phytophthora infestans* est un Oomycète de la famille des Pythiacées. Cet agent pathogène est hétérothallique, c'est-à-dire qu'il possède deux types de compatibilité sexuelle, dits A1 et A2 (Smoot *et al.*, 1958). La production d'oospores, résultant de la reproduction sexuée, intervient uniquement lorsque des souches appartenant à des types sexuels opposés sont en présence. Les oospores, formées au sein des tissus foliaires, sont capables, après la chute des feuilles, de se maintenir plusieurs hivers au champ puis de réinfecter une culture de pomme de terre (Drenth *et al.*, 1995).

En France, la survie de *P. infestans* durant l'hiver se produit sous forme de mycélium présent dans les tubercules infectés restant dans les sols, sur repousses et dans les tas de déchets à proximité des champs cultivés. Effectivement, l'absence du type sexuel A2, jusqu'à ces dernières années, empêchait la reproduction sexuée et donc la formation d'oospores.

En laboratoire, le type sexuel d'une souche est déterminé par confrontation, en conditions contrôlées, de la souche à caractériser avec deux souches de référence, une de type sexuel A1 et l'autre de type A2. Après une semaine d'incubation, une observation au microscope permet de visualiser les oospores (Figure 1), qui se forment uniquement lors de la confrontation de souches de types sexuels opposés (Corbière et Glais, 2005).

**Figure 1** - Oospores de *Phytophthora infestans* : colorée au bleu Coton au grossissement 1 000 à gauche et observées directement dans les tissus foliaires au grossissement 100 à droite.



photos INRA-R. Corbière

**Tableau 1** - Provenance (année et position GPS des parcelles) et nombre d'isolats analysés par type sexuel.

| Année | Parcelle | Position GPS  | Effectif A1 | Effectif A2 |
|-------|----------|---------------|-------------|-------------|
| 2004  | P1-04    | 50°17N, 2°61E | 4           | 1           |
| 2004  | P2-04    | 50°58N, 2°96E | 24          | 25          |
| 2005  | P1-05    | 50°26N, 3°36E | 3           | 1           |
| 2005  | P2-05    | 50°25N, 3°39E | 3           | 1           |
| 2005  | P3-05    | 50°67N, 2°60E | 3           | 1           |
| 2005  | P4-05    | 50°66N, 2°60E | 1           | 2           |
| 2005  | P5-05    | 50°34N, 2°88E | 2           | 3           |
| 2005  | P6-05    | 50°31N, 2°88E | 2           | 2           |
| 2005  | P7-05    | 50°32N, 2°89E | 1           | 2           |

**Tableau 2** - Tableau d'analyse de variance de l'indice d'agressivité dans l'échantillon de souches testé. Les effets significatifs au seuil de 5 % sont indiqués par \*\*\*.

| Effet       | ddl | F    | p         |
|-------------|-----|------|-----------|
| Année       | 1   | 3,72 | 0,0545    |
| Type sexuel | 1   | 5,82 | 0,0162*** |
| Interaction | 1   | 2,00 | 0,1584    |

d'agressivité la plus variable est l'intensité de la sporulation, qui est un paramètre clé pour la propagation des épidémies.

## Que conclure ?

Les résultats obtenus montrent que les souches de type A2 présentes en France ne sont pas plus agressives que les souches A1, et seraient même légèrement moins pathogènes.

L'augmentation en fréquence des souches A2 ne paraît donc pas devoir entraîner à court terme une augmentation rapide du pouvoir

pathogène des populations françaises. Cependant, la présence conjointe des deux types sexuels à des fréquences relativement élevées peut avoir des effets à plus long terme sur l'évolution des populations de *Phytophthora infestans* en France.

D'une part, si la reproduction sexuée remplace (ou s'ajoute à) la reproduction clonale (qui seule existe dans les populations composées d'un seul type sexuel), la diversité génétique présente au sein des populations tendra à augmenter sous l'effet des recombinaisons génétiques. Il peut en résulter l'apparition de nouvelles

souches, dont la survie et l'expansion ultérieure dépendront de leur degré d'adaptation aux conditions environnementales (climat, variétés, etc.). On peut, par exemple, envisager que des souches d'une agressivité supérieure soient sélectionnées et remplacent progressivement la population française actuelle.

D'autre part, qui dit reproduction sexuée de *P. infestans* dit formation d'oospores, capables de survivre plusieurs hivers dans le sol et de germer au retour de la pomme de terre dans la parcelle. Ces oospores constituent alors une source d'inoculum primaire nouvelle, susceptible

présent à la CIMA

**SynTech Research**  
Prestation de Services en Agrochimie et Environnement

**SynTech Research**

www.syntechresearch.fr

Stations expérimentales :  
France, Italie, Espagne, UK, Hongrie,  
Autriche, Etats-Unis, Afrique du Sud

SynTech Research Europe  
33 (0)3 85 36 82 36

Etudes Ecologie et Ecotoxicologie  
Etudes Résidus et Efficacité  
Dossiers d'Homologation

Accréditations BPL et BPE  
Agrément Crédit Impôt Recherche



## 2 - Comment mesure-t-on l'agressivité des souches de *P. infestans* (Glais et Corbière, 2005) ?

L'agressivité des souches de *P. infestans* est déterminée par un test biologique de laboratoire sur folioles détachées. Les folioles sont inoculées par une goutte de 20 µL d'une suspension de sporanges de chaque isolat (à 5.10<sup>4</sup> sporanges/mL), déposée au centre de la foliole, sur sa face inférieure. Les folioles, au nombre de 6 par isolat testé, sont mis à incuber pendant 7 jours en chambre climatisée, régulée à 18 °C pendant la période éclairée (16 heures/jour) et à 15 °C pendant la période d'obscurité (8 heures/jour).

Trois composantes d'agressivité permettent le calcul d'un indice d'agressivité :

- La période de latence (lp) est définie comme le laps de temps entre l'inoculation et l'apparition des premiers sporanges ; elle est déterminée par l'observation quotidienne, à la loupe binoculaire, de l'ensemble des folioles.
- La taille des lésions (ls) est déterminée, 7 jours après inoculation, par mesure du petit et du grand diamètre de la lésion. La surface de la lésion est calculée en l'assimilant à une ellipse.
- La production de sporanges (sp) est également déterminée après 7 jours en dénombrant le nombre total de sporanges produites sur chaque foliole ; les sporanges sont récupérées par une solution saline (*Isoton II*) permettant le comptage au compteur à particules (Coulter Zz, Beckman Coulter France SA).

L'indice d'agressivité (Ai) est calculé en utilisant la formule  $Ai = \ln(ls \cdot sp \cdot 1/lp)$ .

Test d'agressivité sur folioles détachées : nécroses développées 7 jours après inoculation sur la variété Bintje.



ph. INRA - J. Montarry

d'entraîner une plus grande précocité des épidémies. Le développement en France des souches de *P. infestans* du type sexuel A2 peut donc avoir des conséquences importantes, tant sur le plan génétique que sur le plan épidémiologique, pour l'évolution des méthodes de lutte contre le mildiou de la pomme de terre. Toutefois, ces conséquences possibles ne sont aujourd'hui que des hypothèses.

Le fait que les souches de type A2 ne soient pas plus agressives que les souches de type A1, présentes de longue date sur le territoire, est un élément important.

Par ailleurs, nous ne disposons aujourd'hui d'aucune observation détaillée montrant la

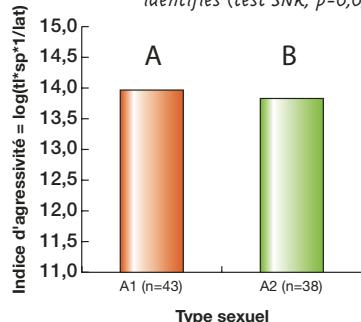
présence d'une reproduction sexuée effective au champ en France ; bien que l'observation simultanée des deux types de souches dans un nombre croissant de parcelles du Nord du pays laisse supposer que cette reproduction est possible. Il est donc essentiel de continuer la surveillance des populations de *Phytophthora infestans* sur le territoire national, engagée depuis près de 20 ans, mais aussi d'évaluer l'importance biologique réelle des oospores dans l'évolution de ces populations.

**Remerciements :** Merci à Ludovic Dubois, du SRPV du Nord-Pas-de-Calais, pour son aide lors de l'échantillonnage des isolats de l'étude. Ce travail a été financé en partie par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche via le contrat de branche « *Préservation de l'environnement par la résistance durable au mildiou chez la pomme de terre* » (décembre 2002-décembre 2005). Josselin Montarry réalise sa thèse de doctorat à l'UMR BiO3P de l'INRA de Rennes dans le cadre d'une convention CIFRE associant Bretagne-Plants (représentant l'Association des créateurs de variétés nouvelles de pomme de terre) et l'INRA.

## Bibliographie

• La bibliographie de cet article est disponible auprès de ses auteurs.

**Figure 2** - Différence d'agressivité mesurée sur la variété Bintje (exprimée par l'indice d'agressivité) selon le type sexuel des souches. A et B représentent les groupes homogènes identifiés (test SNK,  $p=0,05$ ).



## Résumé

La reproduction sexuée de *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou de la pomme de terre, requiert la présence simultanée de souches des deux types sexuels complémentaires, A1 et A2. La récente augmentation de fréquence, en France, des souches du type sexuel A2 confère donc aux populations des régions concernées une capacité accrue de produire des oospores.

La raison de cette augmentation de fréquence reste inconnue ; une hypothèse possible était que les souches A2 possèdent un pouvoir pathogène plus élevé que les souches A1, présentes de longue date en France.

Toutefois, la comparaison de l'agressivité de souches françaises appartenant à chacun des deux types sexuels montre que les souches A1 sont statistiquement plus agressives que les souches A2. La présence conjointe des deux types sexuels ne paraît donc pas devoir entraîner à court terme une augmentation rapide du pouvoir pathogène des populations françaises. Mais elle peut avoir des conséquences sur les sources d'inoculum et, à terme, sur les capacités évolutives des populations de *P. infestans*.

**Mots clés :** mildiou de la pomme de terre, *Phytophthora infestans*, type sexuel, oospores, pouvoir pathogène, évolution.

## Summary

CHANGING POPULATIONS OF *PHYTOPHTHORA INFESTANS*: ARE A2 STRAINS MORE AGGRESSIVE THAN A1 STRAINS?

Sexual reproduction of *Phytophthora infestans*, the cause of potato late blight, requires the simultaneous presence of the two complementary mating types A1 and A2. The recent increase in the frequency of A2 mating type strains in several French regions allows the corresponding populations to produce oospores more readily. The reason for the increase in A2 frequency is still unknown; one possible hypothesis to explain it would be that A2 strains are more pathogenic than their A1 counterparts, present in France for a long time.

The comparison of the aggressiveness of strains from both mating types shows that A1 strains are significantly more aggressive than A2 strains.

The simultaneous presence at relatively high frequencies of both mating types therefore appears unlikely to generate a rapid increase in the pathogenicity of the French *P. infestans* populations. However it may have consequences on primary inoculum sources, and over a period of time, on the evolutionary capacity of these populations.

**Key words:** potato late blight, *Phytophthora infestans*, mating type, oospores, pathogenicity, evolution.

